



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LA APLICACIÓN DE LA
VACUNA DE SARAMPIÓN POR VÍA AEROSOL COMPARADA CON LA
VÍA SUBCUTÁNEA EN NIÑOS SANOS DE 9 MESES DE EDAD**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

DRA. ROSA MARIA WONG CHEW

TUTOR:

DR. JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO

Facultad de Medicina



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

La vacunación contra sarampión por vía aerosol ha demostrado ser inmunogénica y no reactogénica como refuerzo en niños escolares y como inmunización primaria en niños de 12 meses de edad, sin embargo en estudios previos en niños de 9 meses la respuesta inmune ha sido menor por la vía aerosol que por la vía subcutánea, probablemente debido a que es necesaria una dosis mayor. En este estudio se incrementó el tiempo de exposición a la vacuna de sarampión en aerosol respecto a estudios previos en niños de 9 meses de edad.

Objetivo: Comparar la respuesta inmune humoral y celular en niños de 9 meses de edad que reciben la vacuna de sarampión por vía aerosol cuando se incrementa el tiempo de exposición al aerosol de 30 segundos a 2.5 minutos.

Material y Métodos: Se incluyeron 113 niños sanos de 9 meses de edad (53 femeninas, 60 masculinos) que acuden a la consulta externa del Servicio de Pediatría del Hospital General de México, 58 niños recibieron la vacuna de sarampión Edmonston Zagreb por la vía aerosol durante 2.5 minutos (A) ($10^{3.85}$ TCID₅₀/0.5 mL) y 55 por la vía subcutánea (S) ($10^{3.85}$ TCID₅₀/0.5 mL). Se obtuvieron muestras de sangre antes de la vacunación, 3 y 6 meses después. Se realizaron ensayos de inmunidad celular mediante la técnica de timidina tritiada y se midieron las frecuencias de poblaciones celulares mediante citometría de flujo marcando las poblaciones con anticuerpos monoclonales asociados a CD4, CD8, CD27, CCR7, CD62L, CD45RA, y CD19, por otro lado se colectaron los sobrenadantes de los MNSP estimulados con antígeno de sarampión al día 5 y se midieron los niveles de IFN γ por medio de ELISA. La inmunidad humoral se evaluó por medio de la técnica de anticuerpos neutralizantes utilizando un ensayo de neutralización de reducción en placa (NRP), se consideró un título positivo a un resultado de NRP \geq 1:120. Se registraron los síntomas clínicos después de la vacunación por 1 mes.

Resultados: El porcentaje de niños con proliferación de células T positiva (Índice de estimulación, IE >3) fue de 45% y 60% en A vs. 55% y 59% en S a los 3 y 6 meses ($p=0.25$ y 0.91). No hubo diferencias en la media \pm EE del IE entre el grupo aerosol y subcutáneo: pre-vacunación 1.33 ± 0.008 en A vs 1.35 ± 0.008 en S ($p=0.9$) ni después de la vacunación, 4.38 ± 0.63 y 7.91 ± 2.05 en A vs 5.76 ± 0.87 y 6.74 ± 1.65 en S a los 3 y 6 meses respectivamente ($p=0.2$ y 0.66). Se observó un aumento en la media de las frecuencias de la población de linfocitos T CD8+ de memoria (CD62L-CCR7-) en el grupo aerosol a los 3 meses (25.48 ± 2.95 en A vs 18.56 ± 1.72 en S, $p=0.04$), se observó un aumento de las células de memoria sin encontrar diferencias entre los grupos del resto de las poblaciones estudiadas. La media \pm EE en los niveles de IFN γ fueron equivalentes en ambos grupos, (764 ± 50 , 799 ± 59) en A vs (769 ± 50 , 667 ± 70) en S, a los 3 y 6 meses respectivamente ($p=0.94$, 0.12). La seroconversión obtenida fue del 95% en A vs. 91% en S ($p=0.43$). Los títulos Medios Geométricos fueron 373 (IC 95% 441-843) y 1528 (IC 95% 1470-2398) en A vs. 306 (IC 95% 367-597) y 1214 (IC 95% 1160-2193) en S a los 3 y 6 meses post-vacunación ($p=0.14$, 0.49). Los efectos temporalmente asociados a la vacunación (rinitis, tos, exantema, diarrea, artralgias) fueron comparables en ambos grupos, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos.

Conclusión: Utilizando una dosis más alta de vacuna de sarampión por vía aerosol, comparada con estudios previos, la respuesta inmune celular, humoral y los efectos secundarios fueron equivalentes en niños de 9 meses de edad que recibieron la vacuna por vía aerosol y subcutánea. Una exposición más prolongada al aerosol incrementa la inmunogenicidad de la vacuna de sarampión administrada por la vía aerosol en niños de 9 meses.

Palabras clave: Vacuna de sarampión en aerosol, niños sanos, inmunidad celular, inmunidad humoral.

ANTECEDENTES

Epidemiología

La mortalidad global por sarampión ha disminuido en un 78% del año 2000 al 2008, de un estimado de 733,000 en el año 2000 a 164,000 en el año 2008 ¹. A pesar de contar con una vacuna de sarampión, el sarampión constituye el 5% de la mortalidad global por todas las causas en niños menores de 5 años de edad ². La cobertura de vacunación a nivel mundial ha mejorado de un 5% en 1977 a 81% en 1996 y a 83% en 2008. La erradicación del sarampión de una población estable se proyecta que requiere un 95% de cobertura con una vacuna que sea 100% efectiva ^{2, 3}. En México desde la introducción de la vacuna de sarampión en las Campañas Nacionales de vacunación en 1973, la morbilidad por sarampión ha disminuido dramáticamente de 177.4 casos por 100,000 habitantes en 1964 a 2.5 casos por 100,000 habitantes en 1975. En 1990 hubo un brote importante en México y se instaló el régimen de 2 dosis ⁴. De 1997 a 1999 no hubo casos de sarampión autóctono, en el año 2000 se presentaron 30 casos, en 2001 se presentaron 3 casos, en el 2003 44 casos, en el 2004 64 casos, en el 2005 6 casos, en el 2006 23 casos y en el 2009 3 casos no prevenibles por vacunación. Estos casos se han desarrollado en niños menores de 12 meses y adultos jóvenes, importados de otras regiones del mundo ^{4, 5}. En el año 2007, 2008 y 2010 no ha habido casos reportados de sarampión en México ⁵.

La enfermedad causada por el virus de sarampión

El sarampión es una enfermedad exantemática causada por el virus de sarampión, un virus de RNA, del genero *Morbillivirus*, de la familia

Paramyxoviridae. Es altamente contagioso, se disemina por la vía respiratoria, de una persona infectada a otra no inmune por medio de gotitas aerosolizadas de secreciones respiratorias.

El periodo de incubación es de 10 días (8 a 12). Primero se presenta un periodo prodrómico que dura de 2 a 4 días, caracterizado por malestar general, fiebre, coriza, faringitis, conjuntivitis y tos, éste cuadro semeja un resfriado común. Alrededor del día 10 se presentan las manchas de Koplik que son características del sarampión, éstas consisten en manchas blanquecinas sobre un halo eritematoso en la mucosa bucal, duran aproximadamente 7 días.

Alrededor del día 14, se presenta el periodo exantemático; éste consiste en la presencia de un exantema maculo papular eritematoso confluyente de presentación cefalocaudal. Por lo general, primero se afecta la parte posterior de las orejas y de ahí se disemina el exantema hacia la cara, tronco, y extremidades. Alrededor del 3^{er} o 4^o día, el exantema se vuelve color cobrizo y empieza a desaparecer en la misma dirección cefalocaudal, dejando una descamación fina. Este periodo dura alrededor de 7 días.

Las complicaciones que pueden presentarse son: neumonía en 55% de los casos en etapas tempranas de la enfermedad lo que sugiere neumonitis, y hasta en 30% neumonía por sobreinfección bacteriana; otitis media hasta en un 5%; laringitis y laringotraqueítis leve; alteraciones electrocardiográficas hasta en un 19% con miocarditis y pericarditis ocasional; encefalitis en 0.73 por 1000 casos que se presenta por lo general en el periodo exantemático y panencefalitis esclerosante subaguda que es una enfermedad rara degenerativa debido a una infección persistente del sistema nervioso central, que se presenta entre 0.6 y 2.2

por 100,000 casos, en promedio 7 años después de haber padecido la enfermedad.

No existe tratamiento, pero sí prevención mediante la vacuna de sarampión que se administra por vía subcutánea en el brazo, a la edad de 1 año y un refuerzo a los 6 años de edad junto con la vacuna de rubéola y parotiditis ⁶.

Vacuna de sarampión en aerosol

El sarampión es altamente transmisible y puede haber brotes. La vacuna de sarampión en aerosol puede ser útil para la vacunación en masa, debido a que es fácil de administrar y es bien aceptada por madres y niños ⁷.

Desde el desarrollo de la vacuna de sarampión durante los 60's otras vías de administración se han explorado ⁸⁻¹². Además de la vacunación subcutánea que ha demostrado dar una respuesta inmune humoral protectora, la vacuna de sarampión en aerosol se ha probado en varios ensayos clínicos ^{7,12-32} (Tabla 1).

El porcentaje de seroconversión varía de estudio a estudio. Esto puede ser explicado por diferentes condiciones: edad en el momento de la vacunación, cepa del virus de sarampión utilizado en la vacuna, método para administrar el aerosol, presencia de anticuerpos pasivos, ensayo utilizado para medir anticuerpos, etc. En general, estos estudios sugieren que la vacuna de sarampión administrada por vía aerosol tiene varias ventajas: a) no es invasiva, b) produce una buena respuesta serológica y de refuerzo, c) puede ser efectiva en niños con anticuerpos pasivos, d) tiene el potencial de estimular la inmunidad local y prevenir la re-infección. Algunas de las desventajas son: a) el aparato que se utiliza necesita hielo, b) Existe preocupación acerca de la transmisión de virus respiratorios a

través del nebulizador, c) La dosis estimada aplicada es imprecisa ¹². En México, la vacuna de sarampión en aerosol se utilizó en campañas masivas de 1988 a 1990, se vacunaron cerca de 4 millones de niños por éste método en 13 estados ⁷, sin embargo, no se ha hecho seguimiento posterior.

AUTOR	PAIS	AÑO	NO. DE PACIENTES	EDAD	% SERO CONVERSION
Okuno	Japon	1960, 61, 65	22/75/145	7m – 4 a	48 - 100
Kress	EU	1961	30	5 – 7 a	93
McCrumb	EU	1962	46	5 – 10 a	93
Terskikh	URSS	1971	3,305	1-8 a	82 - 85
Sabin	México	1982	48	12 – 47 m	93 -100
Sabin	México	1983	260	4-6 m 12-47 m	87 100
Sabin	México	1984	143	12 – 24 m	72 -100
Whittle	Gambia	1984	51	4-6 m	94
Sabin	Brasil	1985	11	12 – 35 m	100
Torigoe	Ghana	1986	230	5 m - 5 a	59
Fdz. de Castro	México	1986	172	6-8 m	84
Khanum	Bangladesh	1987	340	4-6 m	35
Fdz. de Castro	México	1987	2087	4-6 m	86
Ekune	Nigeria	1989	60	4 – 6 m	86
Fdz. de Castro	México	1990	27	8 m – 15 a	88
Fdz. de Castro	México	1994	152	Escolares	16, 58, 86
Dilraj	Sudáfrica	2000	992	5 – 14 a	84
Sepúlveda Amor	México	2002	562	6 a	98.8
Wong-Chew	México	2004	114	12 m	91
Wong-Chew	México	2006	99	9 m	33
Bennet	México	2009	143	5 a	35

Tabla 1. Estudios clínicos de vacuna de sarampión administrada por vía aerosol.

Los estudios reportados en 2000 y 2002 por Dilraj y Sepúlveda Amor demostraron una mayor inmunogenicidad y menor reactogenicidad en niños escolares al aplicar la vacuna por vía aerosol comparado con la vía subcutánea ²⁶, ²⁸, sin embargo esta mayor respuesta fue en el caso de una vacunación de refuerzo en niños escolares.

En el año 2003 nuestro grupo en colaboración con la Universidad de Stanford y el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) evaluamos por primera vez la respuesta inmune celular, además de la respuesta humoral a la aplicación de una dosis de vacuna de sarampión en aerosol como inmunización primaria en niños de 12 meses de edad. Se encontró seroconversión en 91% del grupo aerosol comparado con 100% del grupo subcutáneo ($p=0.01$), con una respuesta celular del 72% en el grupo aerosol comparado con 87% del grupo subcutáneo ($p=0.06$) ²⁹. En este estudio se utilizó el mismo aparato y la misma dosis que utilizaron en el estudio de Sepúlveda Amor ²⁸ y se demostró que la vacuna aplicada por aerosol a una dosis estándar en niños de 12 meses de edad producía una buena respuesta humoral y celular aun cuando era un poco menor que la vía subcutánea ²⁹.

Posteriormente, realizamos la evaluación de la respuesta inmune de la vacuna de sarampión administrada por vía aerosol y subcutánea en niños de 9 meses de edad, utilizando la misma dosis estándar (aplicación del aerosol por 30 segundos que equivalen aproximadamente a 0.1 mL de la vacuna) que se utilizó exitosamente en estudios previos en niños de 12 meses ²⁹ y en escolares como refuerzo ²⁸. Observamos una seroconversión del 33% en el grupo aerosol en contraste con 92% del grupo subcutáneo ($p = 0.01$), con una respuesta celular en

42% del grupo aerosol comparado con 67% del grupo subcutáneo ($p = 0.01$)³¹. La baja respuesta en el grupo aerosol en niños de 9 meses de edad puede ser explicada por una dosis menor de la vacuna administrada por vía aerosol (646 partículas virales, dosis estimada retenida) en comparación con la subcutánea (19,054 partículas virales). La dosis de la vacuna en aerosol que se aplicó en el nebulizador fue 1/5 de la dosis administrada por vía subcutánea (0.1 mL/dosis vs. 0.5 mL/dosis), y de este 20% se estima que solo el 20 a 25% de la dosis es inhalada y llega a los pulmones, por lo que se administró una dosis 30 veces menor que la administrada por vía subcutánea. Aun cuando la dosis administrada por aerosol fue la misma para el grupo de 12 meses que el grupo de 9 meses, la seroconversión fue de 90% contra 33% respectivamente; esto puede ser explicado por el volumen corriente que es menor en niños de 9 meses comparado con niños de 12 meses y por lo tanto la cantidad de vacuna que se deposita en los alveólos es menor o también puede ser explicada por la inmadurez en la respuesta inmune a los 9 meses comparada con los niños de 12 meses.

Existe muy poca información acerca de la dosis de vacuna de sarampión en aerosol que se debe de administrar en niños de 9 meses de edad para alcanzar buenos niveles de inmunogenicidad. Se han reportado dos estudios en niños de 9 meses con la vacuna en aerosol con la cepa Edmonston-Zagreb en donde la potencia de la vacuna fue de $10^{4.5}$ y $10^{5.2}$ TCID₅₀ con seroconversión de 100% y 84.7% respectivamente^{17, 18, 23}, mientras que la potencia de la vacuna que se utilizó en el último estudio de 9 meses con seroconversión de 33% fue de $10^{4.28}$ TCID₅₀³¹.

Para poder optimizar la inmunización en niños menores de 12 meses mediante la técnica de aerosol, debemos incrementar la dosis retenida, incrementando la potencia de la vacuna o incrementando el tiempo de exposición al aerosol.

Respuesta inmune celular a la vacunación contra sarampión

La inmunidad celular ha sido estudiada en respuesta a la vacuna de sarampión administrada por vía subcutánea ³³⁻³⁶. Algunos estudios sugieren que las respuestas celulares pueden durar más que las respuestas de anticuerpos en algunos niños vacunados ³⁴. El papel exacto de la inmunidad celular en la protección a largo plazo no se conoce. Existe poca información acerca de la inmunidad celular después de la administración de la vacuna de sarampión en aerosol. Se han reportado 72% y 42% de respuestas celulares en niños de 12 y 9 meses de edad que reciben la vacuna de sarampión en aerosol ^{29, 31}, con dosis bajas de vacuna. La capacidad de la vacuna de sarampión en aerosol para producir una respuesta humoral en niños se ha probado, pero se sugiere que la respuesta humoral es limitada en niños menores de 9 meses (80-85% de seroconversión vs. 90 – 100% en niños mayores) cuando se aplica la vacuna por vía subcutánea ³⁷. Se ha demostrado que la respuesta humoral en niños de 6 meses de edad a la vacuna de sarampión administrada por vía subcutánea también es limitada, mientras que la inmunidad celular es equivalente a la de niños mayores ^{33, 35}. No se sabe si la limitación en la respuesta inmune humoral es debida a la ruta de administración o a inmadurez del sistema inmune.

Los linfocitos T CD8+ tienen un papel importante en la respuesta de memoria contra los virus y los T CD4+ también son importantes para la activación de los TCD8+ de memoria. Se sabe que hay poblaciones de linfocitos T de memoria CD4+ y CD8+ en tejidos no linfoides como el parénquima pulmonar, intestino, riñones, hígado, tejido adiposo y cerebro. Estas células T CD4+ y CD8+ de memoria persisten en un estado activado y en el caso de las TCD8+ son citolíticas. Este estado activado ha llevado a designarlas como células T “efectoras” para distinguirlas de las células T “centrales” que se encuentran en órganos linfoides secundarios ³⁸. Se ha postulado que el mantenimiento de la población de linfocitos T CD8+ de memoria depende de las interleucinas 7 y 15, y de los precursores CD8 $\alpha\alpha$ ³⁹. Se describen 3 etapas en el desarrollo de linfocitos T de memoria. Primero, la expansión clonal, que se inicia en tejidos linfoides donde se ponen en contacto células T vírgenes con el antígeno y se diferencian en células efectoras. Semanas después de la eliminación del patógeno, 90% de las células efectoras mueren, ésta fase se denomina fase de contracción o muerte. Las células que sobreviven entran en la fase de memoria, en el que las células T de memoria se estabilizan y se mantienen por largos periodos de tiempo, en el caso de las células T CD8+ se ha postulado que se pueden detectar mediante el receptor de quimiocinas CCR7 ya que éste se encuentra expresado en menor proporción en el caso de TCD8 de memoria en comparación con CCR7 alto en caso de células efectoras ⁴⁰. El marcador CD62L favorece la adhesión de linfocitos en órganos linfoides secundarios; fenotípicamente las células T de memoria central expresan niveles altos de CD62L en su superficie y las células T de

memoria efectoras expresan niveles bajos de esta selectina. Funcionalmente, las células de memoria y efectoras producen en forma rápida citocinas efectoras. La heterogeneidad en la expresión de los receptores CD62L y CCR7 define por lo menos 2 grupos de células T de memoria, las células T de memoria central (T_{CM} ; $CD62L^{alto} CCR7^{+}$) y las células de memoria efectora (T_{EM} ; $CD62L^{bajo} CCR7^{-}$) que migran a tejidos linfoides y no linfoides respectivamente ⁴¹. La molécula coestimuladora CD27 en los linfocitos T CD4+ y T CD8+ se ha asociado a generación de células de memoria ⁴². Los linfocitos B tienen el marcador CD19 en su superficie, que junto con CD27 se describen como linfocitos B de memoria ⁴³. Estos marcadores permiten medir una población de linfocitos de memoria generados en respuesta a un antígeno específico, en éste caso la vacuna de sarampión en aerosol.

En este estudio evaluamos la respuesta inmune celular y humoral al aplicar la vacuna de sarampión por la vía aerosol en una dosis mayor respecto a estudios previos comparada con la vía subcutánea en niños de 9 meses de edad. Se compararon la respuesta inmune celular y humoral en niños que recibieron en forma aleatoria la vacuna de sarampión Edmonston Zagreb por vía aerosol o subcutánea. Se midió la respuesta inmune celular mediante la técnica de timidina tritiada en la cual solo se observa linfoproliferación, además se midió la proliferación específica con marcadores de superficie unidos a anticuerpos monoclonales para detectar el tipo de células que están proliferando específicamente contra el antígeno de sarampión, después de la vacunación y se compararon las respuestas entre las dos vías.

Vacuna de sarampión en aerosol y anticuerpos pasivos maternos

La razón principal por la cual los niños presentan fallas para responder a la vacuna de sarampión, especialmente en niños menores de 12 meses, es la presencia de anticuerpos pasivos maternos^{35, 44-48}. La vacuna administrada por vía aerosol entra al organismo por la ruta natural, y del tracto respiratorio se dirige directamente a los nódulos linfáticos donde la respuesta inmune se lleva a cabo. Los inmunoblastos sensibilizados por el antígeno viajan a través del organismo sembrando las superficies mucosas donde se produce IgA^{11, 49}. En teoría, hay contacto mínimo con los anticuerpos circulantes lo que evita la neutralización del virus vacunal por los anticuerpos pasivos y permite una mejor respuesta humoral y celular en comparación con la vacunación por vía subcutánea. Hay evidencia de que la vacuna de sarampión administrada por vía aerosol en niños de 4 a 6 meses de edad es inmunogénica en presencia de anticuerpos pasivos maternos^{17, 18, 20, 21}. En este estudio se propuso explorar como los anticuerpos pasivos afectan el desarrollo de la respuesta inmune (sensibilización de células T y la producción de anticuerpos) con la administración de la vacuna de sarampión en aerosol a una edad en la que se está desarrollando el sistema inmune. Los anticuerpos pasivos fueron medidos en niños de 9 meses de edad antes de la administración de la vacuna de sarampión EZ por vía aerosol o subcutánea. Se midió la inmunidad celular y humoral antes y 12 semanas después de la vacunación y se propuso analizar las respuestas en cada grupo de acuerdo a los niveles de anticuerpos pasivos pre vacunación.

Vacunación en aerosol y respuesta inmune local

El virus de sarampión es transmitido por aerosol y entra a la vía respiratoria. La infección inicial se establece en el tracto respiratorio, de ahí se propaga a los tejidos linfáticos locales. La amplificación del virus en nódulos linfáticos regionales da como resultado la aparición de una viremia y la diseminación del virus a través de la sangre para infectar varios órganos^{47, 49}. La inmunidad local que contiene principalmente IgA secretora en las secreciones seromucosas defienden las superficies externas del cuerpo de varios microorganismos incluyendo virus⁵⁰. Una ventaja potencial de la administración en aerosol es la estimulación de la inmunidad local y la prevención de infecciones y reinfecciones^{11,12}.

Respuesta inmune a dos dosis de vacunación antisarampionosa

El grupo de Infectología Pediátrica de la Universidad de Stanford, ha sugerido que un régimen de 2 dosis de vacuna de sarampión, con la primera dosis antes del año de edad y un refuerzo a los 12 a 15 meses de edad, produce una respuesta celular y humoral mayor que una sola dosis a los 12 a 15 meses de edad⁵¹. Esta observación puede ser explicada por una sensibilización de células T a edad temprana, aun cuando no haya producción o haya una producción muy baja de anticuerpos, y el aumento de ambas (respuesta celular y humoral) con una 2ª dosis³⁵. Si la vacuna de sarampión en aerosol sensibiliza mejor a las células T debido a la evasión de los anticuerpos pasivos, la respuesta celular después de una dosis de refuerzo puede ser mayor que la respuesta con la vacuna subcutánea. En este estudio se evaluó la respuesta inmune 3 meses después de una dosis de refuerzo con sarampión, paperas y rubéola (SRP) en niños que

recibieron su primera dosis de vacuna de sarampión a los 9 meses de edad por la vía aerosol. Las respuestas se compararon con aquellos niños que recibieron su primera vacunación por inyección subcutánea.

Inmunosupresión asociada a la vacunación con sarampión

Se puede presentar inmunosupresión en muchas infecciones virales^{52, 53} y en ocasiones también se puede presentar después de la inmunización con vacunas de virus vivos⁵⁴⁻⁵⁶. La respuesta de células T puede disminuir en forma transitoria por la vacuna de sarampión de virus vivos atenuados^{56, 57}. En este estudio se exploró la respuesta de los linfocitos T al antígeno viral de sarampión en comparación con toxoide tetánico que es un antígeno bacteriano, después de la administración de la vacuna de sarampión. Las células T de los niños son sensibilizadas con éste antígeno debido a que reciben toxoide tetánico en la vacuna DPT+Hib+HBV a los 2, 4 y 6 meses de edad que está incluida en el Programa Nacional de Vacunación. Estos experimentos evaluaron la inmunidad celular específica y no específica después de la administración de la vacuna de sarampión y si existe alguna diferencia en la administración en aerosol y subcutánea.

En este estudio evaluamos la vacuna de sarampión administrada por vía aerosol en niños sanos de 9 meses de edad y determinamos si una dosis equivalente a la dosis administrada por vía subcutánea fué efectiva y segura para niños de esta edad, midiendo la inmunidad celular y humoral y la probable inmunosupresión asociada a la vacunación mediante la medición de

linfoproliferación a diferentes antígenos en niños inmunizados mediante la técnica de aerosol, así como la seguridad de la vacunación en aerosol con una dosis mayor a la utilizada en estudios previos. También analizamos el papel de la vía de administración en aerosol en la inmunogenicidad de la vacuna en presencia de anticuerpos pasivos maternos, y analizamos si esta forma de administración de la vacuna es más útil para la sensibilización temprana de células T a los 9 meses de edad, antes de la dosis usual de SRP a los 12 a 15 meses de edad.

La Organización Mundial de la Salud propuso el año 2000 para la erradicación del sarampión en América, el año 2010 para la erradicación del sarampión en Europa y la región mediterránea del Este y el año 2012 para la Región Pacífico Oeste ⁵⁸. Además de los beneficios potenciales para la inmunogenicidad, la administración por mucosas de la vacuna de sarampión puede tener ventajas prácticas para los programas de erradicación del sarampión. La oportunidad de llevar a cabo ensayos para medir la inmunidad humoral y celular en el contexto de un ensayo clínico controlado, nos permite responder preguntas esenciales acerca de la posibilidad de utilizar vacuna de sarampión en aerosol para facilitar la erradicación del sarampión en el mundo y la posibilidad de desarrollar una respuesta inmune más efectiva para vacunar niños menores de 1 año de edad con ésta metodología.

JUSTIFICACION

El sarampión es una enfermedad de distribución mundial y hasta el momento siguen falleciendo niños por esta causa.

Los brotes que se han reportado en países con altas coberturas en el continente americano han sido principalmente en adultos jóvenes quienes no fueron vacunados o tienen fallas primarias o secundarias a la vacunación contra sarampión; y en niños menores de 1 año de edad ^{4, 5}. La vacuna se aplica a los 12 meses para aumentar el porcentaje de seroconversión, ya que a los 9 meses es sólo del 85% comparado con 95% a los 12 meses de edad debido a la presencia de anticuerpos pasivos maternos ³⁷. Sin embargo, se ha observado que un alto porcentaje de hijos de madres vacunadas pierden la inmunidad pasiva desde los 6 meses de edad, dejándolos susceptibles a infección por sarampión ⁵⁹. En México los brotes que se han presentado en los últimos 5 años han sido también en menores de 1 año de edad y en adultos jóvenes por lo que es necesario estudiar métodos alternativos para la vacunación en menores de un año que permita vacunar aun en presencia de anticuerpos pasivos maternos.

La vacuna de sarampión con una alta potencia aplicada por vía aerosol ha demostrado una alta seroconversión en niños menores de un año con presencia de anticuerpos pasivos maternos ^{17, 18, 20}. Es importante estudiar una dosis mayor y evaluar la inmunogenicidad de la aplicación de la vacuna de sarampión en aerosol en niños menores de 12 meses. Este grupo etáreo podría obtener grandes beneficios con la vacuna de sarampión en aerosol, debido a que aparentemente evade la neutralización de los anticuerpos maternos circulantes. Permitiría vacunar

a niños menores de 12 meses de edad mediante la técnica del aerosol y así proteger a los niños que pueden ser susceptibles ante posibles brotes.

PLANTEAMIENTO DE LOS PROBLEMAS

El sarampión sigue causando muertes en niños menores de 5 años de edad. La vacuna de sarampión es muy efectiva en niños de 12 meses de edad; en niños de 9 meses su efectividad disminuye debido a la presencia de los anticuerpos pasivos maternos. La vacuna de sarampión en aerosol podría ser útil en niños de 9 meses debido a que se aplica por mucosas y esto mejoraría la respuesta inmune a la vacuna.

La vacuna de sarampión en aerosol ha demostrado ser efectiva y segura en niños escolares y en niños de 12 meses, pero en niños de 9 meses la misma dosis que se ha utilizado previamente ha dado una pobre seroconversión. El aumentar el tiempo de exposición a la vacuna de sarampión en aerosol para dar la misma dosis por vía subcutánea podría dar una respuesta inmune adecuada, por lo que nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

PREGUNTAS DE INVESTIGACION

PRINCIPAL

1. Al incrementar el tiempo de exposición del aerosol de 30 segundos a 2.5 minutos, ¿será mayor o igual la respuesta inmunológica celular y humoral con una dosis de $10^{3.85}$ /0.5 mL de la vacuna de sarampión en comparación

con $10^{3.85}$ /0.5 mL administrada por la vía subcutánea en niños sanos de 9 meses de edad?

SECUNDARIAS

2. ¿Será mayor o igual la respuesta inmune de la vacuna administrada por vía aerosol comparada con la vía subcutánea en presencia de anticuerpos pasivos maternos?
3. ¿Será mayor o igual la respuesta inmune de refuerzo con una 2ª vacunación con SRP a los 12 meses en el grupo aerosol comparado con la vía subcutánea?
4. ¿Habrà inmunosupresión asociada a la vacuna de sarampión por vía aerosol o subcutánea?
5. ¿Habrà diferencia en los efectos secundarios a la vacunación contra sarampión por la vía aerosol comparada con la vía subcutánea?

HIPOTESIS

PRINCIPAL

1. La administración de la vacuna de sarampión a una dosis de $10^{3.85}$ /0.5 mL administrada por vía aerosol incrementando el tiempo de exposición de 30 segundos a 2.5 minutos producirá una respuesta inmune celular y humoral mayor o igual que la aplicación de la vacuna por vía subcutánea a una dosis de $10^{3.85}$ /0.5 mL.

SECUNDARIAS

2. La inmunogenicidad será mayor o igual en aquellos niños con presencia de anticuerpos pasivos maternos que reciben la vacuna por vía aerosol que aquellos con anticuerpos pasivos que reciben la vacuna por vía subcutánea.
3. La respuesta inmune celular y humoral será mayor o igual después de una 2ª vacunación con SRP a los 12 meses de edad en el grupo de niños que recibió una inmunización primaria con sarampión por el método de aerosol comparado con el grupo que recibió la vacuna por vía subcutánea.
4. La respuesta celular a antígenos bacterianos y virales será igual en aquellos niños que reciben la vacuna de sarampión por vía aerosol.
5. No habrá diferencia en los efectos adversos entre el grupo que recibe la vacuna de sarampión por vía aerosol y el grupo que recibe la vacuna subcutánea.

OBJETIVOS

PRINCIPAL

1. Comparar la respuesta inmune celular y humoral de la vacuna de sarampión a una dosis de $10^{3.85}$ /0.5 mL administrada por vía aerosol durante 2.5 minutos con la administración por la vía subcutánea a una dosis de $10^{3.85}$ /0.5 mL en niños sanos de 9 meses de edad.

SECUNDARIOS

2. Evaluar el papel de los anticuerpos pasivos maternos en la respuesta inmune a la vacuna de sarampión administrada por vía aerosol y por vía subcutánea.
3. Evaluar la inmunidad celular y humoral a la vacuna de sarampión en niños de 15 meses de edad que reciben un refuerzo con SRP a los 12 meses de edad y que previamente recibieron sarampión a los 9 meses por vía aerosol o por vía subcutánea.
4. Evaluar la respuesta inmune celular a antígenos bacterianos y virales para ver la posible inmunosupresión asociada a la vacunación con sarampión por la vía aerosol y subcutánea.
5. Evaluar los efectos secundarios a la administración de la vacuna por vía aerosol y subcutánea.

DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO

TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio experimental, aleatorizado, prospectivo, longitudinal, abierto.

VACUNA DE SARAMPION

Vacuna de virus vivos atenuados para inmunización contra sarampión (cepa Edmonston Zagreb), liofilizada, dosis estándar $10^{3.85}$ PFU/0.5 mL para la aplicación subcutánea (que se tomará como el grupo control) y $10^{3.85}$ PFU/0.5 mL para aplicación en aerosol (incrementando el tiempo de exposición de 30 segundos a 2 y 1/2 minutos) producida por el Serum Institute of India, que es el método de aplicación de la vacuna a estudiar.

POBLACION DE ESTUDIO

La población de estudio son niños de 9 meses de edad (\pm 4 semanas), sanos, residentes del Distrito Federal, México, que acuden a la consulta del niño sano en el Programa de Lactancia Materna del Servicio de Pediatría del Hospital General de México.

El tamaño de la muestra se ha calculado en 150 niños (el cálculo del tamaño de la muestra se especifica en la sección de análisis estadístico).

CRITERIOS DE INCLUSION

Niños sanos de 9 meses de edad.

Niños de término.

Niños con peso mayor de 2.500 kg al nacer.

Cartilla de vacunación completa.

CRITERIOS DE EXCLUSION

Niños que hayan sido vacunados previamente.

Niños cuyos padres o tutores refieran que los niños padecieron sarampión.

Niños con enfermedades subyacentes crónicas.

Niños con desnutrición moderada a grave.

Niños con inmunodeficiencias.

Niños prematuros.

Niños con alergia a los componentes de la vacuna.

Niños con hiperreactividad bronquial

Niños con familiares con inmunosupresión

CRITERIOS DE ELIMINACION

Niños que no sea posible tomar una segunda y/o tercera muestra para análisis de la respuesta inmune celular y humoral.

VARIABLES

Variable independiente

1) Vacuna Edmonston Zagreb anti-sarampionosa (dosis estándar) vía aerosol o subcutánea

Definición conceptual: Antígeno de sarampión de la cepa Edmonston-Zagreb que produce una respuesta inmune humoral y celular administrada por vía aerosol o vía subcutánea

Definición operacional: Vacuna viva para inmunización contra sarampión (cepa Edmonston Zagreb), liofilizada, dosis estándar $10^{3.85}$ PFU/0.5 mL producida por el Serum of Institute of India LTD, que se aplicará por vía subcutánea en la región deltoidea del brazo y se utilizará como grupo control y dosis estándar $10^{3.85}$ PFU/0.5 mL aplicada aumentando la exposición de 30 segundos a 2 y medio minutos por vía aerosol con el método del Dr. Fernández de Castro, que es el método a evaluar.

Escala de medición: Cualitativa dicotómica

Variables dependientes

1) Inmunidad mediada por células

Definición conceptual: Sistema de defensa mediada por células T de memoria expuestas a un antígeno.

Definición operacional: Número de células T que responden al estímulo antigénico con la vacuna de sarampión. Se medirá por medio de la técnica de linfoproliferación con timidina tritiada. Se obtiene el índice de estimulación dividiendo la media de las cuentas por minuto (cpm) de las células estimuladas con antígeno entre la media de cpm de las células estimuladas con control, considerándose un índice ≥ 3 como positivo. También se medirá por medio de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos y citometría de flujo y se compararán las medias de las frecuencias celulares antes y después de la vacunación y entre los grupos.

Escala de medición: Cuantitativa continua y cualitativa dicotómica

Categoría: Media del IE de cada grupo y de las frecuencias celulares por citometría de flujo y Positivo ($IE \geq 3$) o negativo ($IE < 3$)

2) Inmunidad humoral.

Definición conceptual: Sistema de defensa del cuerpo mediada por anticuerpos y factores solubles.

Definición operacional: Titulaciones de anticuerpos IgG por medio de la técnica de neutralización en placa del Dr. Bellini para sarampión. Se calcularán los títulos medios geométricos (TMG) de anticuerpos y el porcentaje de seroconversión.

Escala de medición: Cuantitativa continua y cualitativa dicotómica.

Categoría: Título medio geométrico para cada grupo expresado en mUI/mL y porcentaje de seroconversión (aumento de por lo menos 4 veces el título basal de anticuerpos: seroconversión o no seroconversión)

3) Efectos clínicos adversos

a. Variable: Fiebre

Definición conceptual: Síndrome caracterizado por aumento de la temperatura corporal, taquicardia y taquipnea.

Definición operacional: Se mide la temperatura axilar en cada consulta y se registra si los padres toman la temperatura de los niños en caso de que presenten fiebre. Se considera presencia de fiebre en aquellos niños que tengan temperatura axilar $\geq 38^{\circ}$ C en una toma.

Escala de medición: Cualitativa dicotómica

Categoría: Presente, ausente.

b. Variable: Rinorrea

Definición conceptual: Secreción nasal mucosa.

Definición operacional: Presencia de moco transparente por narinas en el período de 14 días posteriores a la vacunación.

Escala de medición: Cualitativa dicotómica

Categoría: Presente, ausente.

c. Variable: Tos

Definición conceptual: Exhalación brusca por la boca como resultado del aumento de presión a nivel de la epiglotis

Definición operacional: Presencia de tos en cualquier momento del día durante los 14 días posteriores a la vacunación.

Escala de medición: Cualitativa dicotómica

Categoría: Presente, ausente.

d. Variable: Exantema

Definición conceptual: Enfermedad eruptiva, que consiste en la presencia de pápulas finas eritematosas, confluentes en la piel.

Definición operacional: Se realizará una exploración física en la consulta de seguimiento y se registrará la presencia de exantema en el periodo posterior a la vacunación.

Escala de medición: Cualitativa dicotómica

Categoría: Presente, ausente.

e. Variable: Conjuntivitis

Definición conceptual: Inflamación de la conjuntiva

Definición operacional: Presencia de ojos rojos, llorosos, y/o ardor en los ojos posterior a la vacunación, durante un período de 14 días.

Escala de medición: Cualitativa dicotómica

Categoría: Presente, ausente.

f. Variable Diarrea Definición conceptual: Evacuación intestinal frecuente, disminuida de consistencia y con aumento en el número.

Definición operacional: Presencia de evacuaciones disminuidas de consistencia, con aumento de la frecuencia y la cantidad, posterior a la vacunación durante un período de 14 días.

Escala de medición: Cualitativa dicotómica

Categoría: Presente, ausente.

g. Variable: Artralgias

Definición conceptual: Dolor en las articulaciones.

Definición operacional: Presencia de dolor articular en el periodo de 14 días posterior a la vacunación.

Escala de medición: Cualitativa dicotómica

Categoría: Presente, ausente.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

El reclutamiento de los pacientes fue realizado en el Servicio de Pediatría del Hospital General de México. Existe una base de datos de una cohorte de niños sanos que han nacido en el Hospital General, la cual cuenta con los datos demográficos de los niños, su dirección y teléfono. El grupo de lactancia Materna del Servicio de Pediatría y el grupo del Departamento de Medicina Experimental de la UNAM, ubicaron en forma telefónica a las madres de niños de 8 meses de edad y las invitaron a que sus hijos participaran en el estudio. Los niños y sus padres acudieron al consultorio 12 del Servicio de Pediatría en donde personal de la UNAM y dos pediatras del Hospital General les explicaron ampliamente el estudio y obtuvieron el consentimiento informado del padre o tutor. Se realizó la historia clínica del niño y la evaluación física incluyendo el peso y la talla del niño para determinar su estado de nutrición. Se utilizaron las tablas del Manual de Procedimientos técnicos (Nutrición) del Programa de Atención a la Salud del Niño del Centro Nacional de Salud para la Infancia y la Adolescencia de la Secretaría de Salud para determinar el percentil para peso, talla y peso para la talla, en caso de desnutrición no se incluyó al niño en el estudio. Los niños fueron distribuidos en forma aleatoria en una relación 1:1 con una lista de números aleatorios obtenida mediante Epistats, para recibir una dosis de vacuna por vía aerosol o por vía subcutánea de la vacuna de sarampión.

Los niños que recibieron una dosis estándar de la preparación parenteral se les aplicó 0.5 ml de vacuna liofilizada reconstituida, inyectada en forma subcutánea en la cara externa del brazo y a los niños que recibieron la preparación por vía aerosol recibieron por 2 y medio minutos por aerosolización

0.5 ml de la vacuna. Se les tomaron muestras de sangre (3-5 mL) por venopunción antes y 12 semanas después de la vacunación para determinación de anticuerpos neutralizantes y estudios de linfoproliferación. Después de haber recibido la vacuna triple viral (sarampión, paperas y rubéola) se tomó una muestra de sangre (3-5 mL) a los 15 meses de edad para medir inmunidad celular y anticuerpos y evaluar la respuesta inmune a una revacunación.

Estos procedimientos fueron realizados por Pediatras en el consultorio 12 de Pediatría y por personal de la UNAM con amplia experiencia en la aplicación de la vacuna en aerosol y en la toma de muestras de sangre.

A los niños participantes se les realizó seguimiento telefónico cada semana y se citó a los 30 días después de la inmunización en el consultorio 12 de Pediatría para vigilar la reactogenicidad. Se les dió una tarjeta en donde los padres anotaron los efectos adversos que presentaron. En la visita de seguimiento se tomó la temperatura oral y se obtuvo información acerca de las reacciones adversas: tos, rinorrea, fiebre, exantema, cefalea, malestar, vómito, diarrea, artralgias, artritis, anorexia u otros síntomas. Se guardaron los expedientes con anotaciones de cada niño en el Laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología clínica, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM, México, D. F. Estos expedientes incluyen las formas de consentimiento e información clínica de los padres o tutores acerca de los participantes en el estudio, así como la falta de inmunización previa con sarampión o la historia de enfermedad. Se pidió a los padres o tutores que notificaran a los investigadores en forma inmediata en caso de que se presentara exantema, fiebre o cualquier reacción secundaria durante las 12 semanas después de la

inmunización. Todos los participantes que presentaron uno o más síntomas semejantes a sarampión fueron evaluados en el hospital en las primeras 24 horas de iniciados los síntomas y se vigiló estrechamente al paciente. Se consideró hospitalizar a los niños que cursaran con alguna reacción grave a la vacuna como choque anafiláctico, encefalitis o neumonía. A todos los niños se les aplicó una dosis de vacuna contra sarampión rubéola y paperas (SRP) administrada por vía subcutánea a los 12 meses de edad, cumpliendo con las recomendaciones de vacunación para la edad.

Método de aplicación del aerosol.- El aparato que se utilizó es el diseñado por el Dr. Fernández de Castro (Diagrama 1) con ligeras modificaciones, que se ha utilizado en los estudios que han mostrado una efectividad del método del aerosol y se ha utilizado para inmunizar a 4 millones de niños en México durante los 80's⁷. Consiste en un nebulizador (Medex 4107) que se encuentra dentro de un vaso que contiene hielo escarchado el cual permite mantener la vacuna fría. El nebulizador funciona mediante la generación de aire mediante un compresor eléctrico de 45 psi. En éste estudio se utilizó un compresor médico (Pulmo Aide 3655, DeVilbiss); el aerosol sale a través de un tubo unido a un cono fabricado en teflón y dentro del cono se coloca un cono de papel que se cambia con cada niño. El cono se aplica sobre la nariz y boca de cada niño durante 2 minutos y medio con el propósito de aplicar la misma dosis que se aplica por vía subcutánea.

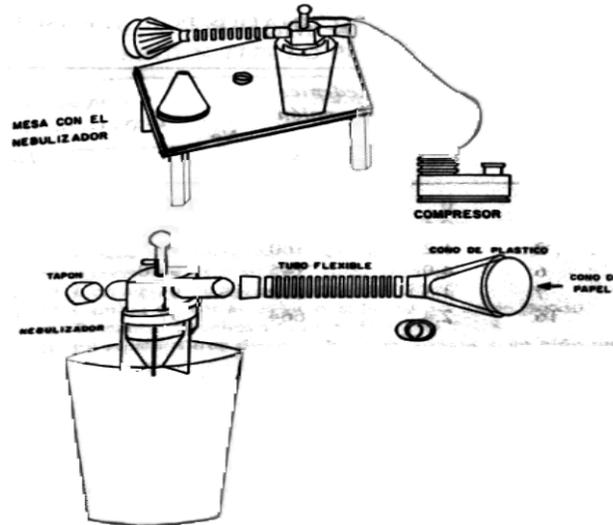


Diagrama 1. Diagrama del equipo utilizado para la administración del aerosol. De: Fernández de Castro. La vacunación contra el sarampión. Situación en México y América. Bol Med Hosp. Infant Mex. 1990;47(7):449-461.

ESTUDIOS DE LABORATORIO

Se colectaron muestras de sangre antes, 3 meses después de la inmunización con sarampión y 3 meses después de la inmunización con SRP en el consultorio 12 del Servicio de Pediatría del Hospital General del México. Se obtuvo un tubo heparinizado con 3-5 mL de sangre total para los estudios de células T y B, otro tubo sin anticoagulante para obtener 200-500 μ L de suero por paciente para pruebas serológicas.

Ensayos de anticuerpos neutralizantes contra sarampión. El suero se guardó a -70° en el laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología Clínica del Departamento de Medicina Experimental, UNAM y se enviaron a la Food and Drug Administration, Maryland, Estados Unidos para su procesamiento. Las 2 o 3 muestras secuenciales antes y después de la vacunación y en su caso

después del refuerzo con SRP, se corrieron en paralelo y se midieron anticuerpos neutralizantes utilizando un ensayo de neutralización de reducción en placa (NRP)⁶⁰. Se realizaron diluciones 1:4 del suero inactivado previamente (56 °C por 30 min) empezando por una dilución 1:4 con medio de mantenimiento (DMEM más 2% de suero fetal bovino, GIBCO). Se mezcló con volúmenes iguales del virus de sarampión que contiene aproximadamente 30 unidades formadoras de placa (ufp). Cada una de estas diluciones se agregaron a cajas de 24 pozos, que contenían una monocapa de células Vero. Se incubaron por 1 hr a 37 °C con 5% de CO₂. Se incluyó un suero de referencia por triplicado en cada corrida. La prueba se incubó y se leyó al 7º día. El título de anticuerpos neutralizantes se define como la dilución del suero que reduce el número de placas en un 50%, los resultados se interpretan como negativos con un título < 1:4 mUI/mL; seroprotección con un título >1:120 mUI/mL⁶¹ y seroconversión como el aumento de 4 veces en el título de anticuerpos detectables en comparación con los basales.

Ensayos de inmunidad mediada por células. Los ensayos de proliferación de células T se realizaron en el laboratorio de Infectología e Inmunología del Departamento de Medicina Experimental, UNAM.

Las células mononucleares de sangre periférica (MNSP) se separaron de la sangre completa por medio de un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque y se colocaron en micropozos de placas de 96 a concentraciones de 3.0×10^5 /pozo en RMPI 1640 (Gibco, Gaithersburg, MD) y suero humano normal al 10% (Sigma, St. Louis, MO). El antígeno de sarampión preparado de lisados de células Vero infectadas, o un preparado de células no infectadas como control se agregaron a concentraciones de 1:8, 1:16 y 1:32 en pozos por triplicado. Se agregó toxoide

tetánico (Calbiochem, La Jolla, CA) a concentraciones de 0.5 y 1 μ L por pozo por triplicado y medio de cultivo como control. Se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por 5 días. La proliferación de células T se midió añadiendo ³[H]-timidina (2.5 μ Ci/pozo) después de 5 días de incubación por 6-18 horas. Se cosecharon las células y se realizó el conteo de las cuentas por minuto. El índice de estimulación (IE) se calculó como la media de las cuentas por minuto (cpm) en los pozos estimulados con antígeno de sarampión divididos entre la media de cpm en los pozos control. Un IE positivo para sarampión es ≥ 3.0 , con base en la media y la desviación estándar de las respuestas en niños antes de la vacunación en los estudios previos. Se utiliza fitohematoglutinina (Difco, Detroit, MI) como control mitógeno positivo para respuesta a antígenos, para detectar supresión no específica de la inmunidad celular asociada a la vacunación con sarampión.

También medimos la respuesta inmune celular mediante frecuencias celulares de poblaciones de células T y B de memoria. En la literatura se reportan a las células T CD8⁺ y CD4⁺ con marcadores de activación como CCR7⁻ y CD62L⁻ ⁴¹ y CD8⁺ o CD4⁺ con CD27⁺ ⁴² como poblaciones de memoria y el marcador CD45RA como marcador de activación, así como los linfocitos con marcadores CD19⁺ y CD27⁺ ⁴³ como células B de memoria. Se colocaron 3x10⁵ MN5P en RPMI 1640 (Gibco, Gaithersburg, MD) y suero humano normal al 10% (Sigma, St. Louis, MO) por pozo estimulados con antígeno de sarampión por 5 días y se tiñeron con anticuerpos monoclonales contra CD8 PE Cy7, CD4 PE Cy5, CD19 PE, CD45RA PE, CD27 FITC, CD62L APC/AF750 y CCR7 APC (Pharmingen, Becton Dickinson) y se midieron por citometría de flujo en el

citómetro (FacsDiva, Becton Dickinson). Se compararon la media de la frecuencia antes, 3 y 6 meses después de la vacunación de las células estimuladas con el antígeno de sarampión y la media entre los grupos aerosol y subcutáneo.

Ensayos de Interferón gamma. En aquellos niños cuyas muestras fueron suficientes para montar ensayos de citocinas, se colectaron los sobrenadantes de los MNSP estimulados con antígeno de sarampión al día 5. Estos fueron guardados a -70°C y posteriormente se midieron los niveles de $\text{IFN}\gamma$ por medio del método de ELISA (Biosource International, Inc). Se agregaron estándares de concentraciones de $\text{IFN}\gamma$ ya conocidas y los sobrenadantes de MNSP estimulados con antígeno por duplicado a pozos de micro placas previamente cubiertos con un anticuerpo monoclonal específico para $\text{IFN}\gamma$. Después de la primera incubación, el $\text{IFN}\gamma$ se unió simultáneamente por un lado al anticuerpo pegado a la placa y por otro lado a un anticuerpo biotinilado. Después de remover el exceso del 2^o anticuerpo, se agregó estreptavidina-peroxidasa, la cual se unió al anticuerpo biotinilado completando un complejo de 4 componentes. Después de una 2^a incubación y lavado se agregó un substrato para producir color. La intensidad de este color fue directamente proporcional a la concentración de $\text{IFN}\gamma$ presente en los estándares. La media del pico en la concentración de $\text{IFN}\gamma$ antes, a los 3 y 6 meses después de la vacunación se utilizó para análisis de datos.

Análisis estadístico

Tamaño de la muestra. Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó el programa Epistats, para proporciones no pareadas. Se determinó una proporción de 0.86 de respuesta inmune (ya sea celular, humoral o ambas) para el grupo en estudio con base en estudios previos en donde se encontró 86% de respuesta inmune (celular y/o humoral) en el grupo que recibió aerosol³¹, con una detección mínima de 0.17. Un total de 150 niños fueron reclutados en el estudio. Este tamaño de muestra permitió detectar diferencias entre las respuestas mediadas por células y humoral entre los que recibieron la vacuna en aerosol y sucutánea con $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.1$ y 90% de poder. El tamaño de la muestra permitió un 30% de abandono, calculando que con 105 pacientes que completaran el estudio sería suficiente para detectar estas diferencias. Este porcentaje de pérdida se calculó con base en que el reclutamiento fue telefónico y las pérdidas son mayores cuando no hay seguimiento con visitas domiciliarias.

Métodos. Para determinar la respuesta inmune humoral, los recíprocos de los títulos de NRP se transformaron, se calcularon los títulos medios geométricos (TMG). Las diferencias entre los títulos de anticuerpos entre grupos fueron evaluados por la prueba U de Mann-Whitney. Los IE en pacientes individuales que fueron vacunados se compararon utilizando la prueba t de Student; la prueba t pareada se utilizó para comparar datos pareados. Las pruebas Chi cuadrada y prueba exacta de Fisher fueron utilizadas para comparar el número de vacunados en cada cohorte que presentaron respuestas de anticuerpos o proliferación y para

contrastar los efectos adversos en cada grupo. La significancia estadística se define como una $p < 0.05$ para todos los análisis que se llevaron a cabo. Las variables analizadas incluyeron comparación entre cohortes de niños vacunados por ambas vías de desarrollo de una respuesta sérica detectable, títulos de anticuerpos seroprotectores (NRP >120), desarrollo de respuesta celular detectable mediante el IE > 3.0 , la respuesta celular de memoria medida mediante citometría de flujo e interferon gama y los efectos adversos en cada cohorte.

Se define como un “procedimiento exitoso” si las respuestas celular y humoral son iguales o mejores cuando se aplica la vacuna por vía aerosol que por vía subcutánea. Esto se reflejará en resultados en que no se encuentre diferencia estadística en la proporción de respuestas humoral y celular entre los grupos o en una diferencia estadística significativa siendo mayor la respuesta en el grupo aerosol.

Consideraciones éticas

Este protocolo fue aprobado por las Comisiones de Ética, Investigación y bioseguridad del Hospital General de México, Hospital Infantil de México Federico Gómez y Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se explicó ampliamente el estudio a los padres o tutores de los niños que aceptaron participar en el estudio y se solicitó el consentimiento informado firmado por los padres o tutores. Se aplicó la vacuna SRP (sarampión, paperas y rubéola) a todos los participantes al año de edad.

Consideraciones de bioseguridad

Se aplicó la vacuna en aerosol en un cuarto separado, con ventilación y en el que solo estuvo el personal del estudio y los niños a vacunar con sus madres. Se tomaron muestras de sangre con técnica cerrada con mariposas y tubos de vacutainer en el consultorio 12 del Servicio de Pediatría del Hospital General de México, se colocaron en bolsas de plástico sellables y se colocaron en un contenedor de plástico para su transportación. Se procesaron las muestras en el Laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología clínicas, de la UNAM utilizando métodos de cloración y autoclave para el desecho de RPBI, colocando esos desechos después en el bote de RPBI que se colecta y se desecha con los RPBI del Hospital General de México en forma rutinaria de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-OS7-ECOL-SSA1-2002.

Se utilizó TMB para determinar IgG por ELISA, éste se colectó en un recipiente de plástico y se llamó a una compañía especializada en el manejo de éstos desechos para retirarlos del laboratorio.

En el laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología clínica de la Facultad de Medicina de la UNAM se cuenta con un área específica para manejo de material radiactivo, que ya ha sido inspeccionado por la CNSCI, y se contaba con la licencia y ahora con la exención de la licencia por el nivel tan bajo de radiación que se utiliza. El desecho de ^3H se coloca en un área de recolección temporal ubicado en el último piso del edificio donde se hay 2 bidones que se encuentran en un contenedor con llave. Una vez que se junta lo suficiente se envía al ININ para su desecho definitivo.

Recursos

Este estudio fué financiado por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos por el proyecto RO1 TW006193, Investigador Principal: Rosa María Wong Chew.

El grupo de lactancia materna cuenta con 2 pediatras neonatólogos, una enfermera y una secretaria. Personal de la UNAM junto con los 2 pediatras del Hospital General se encargaron de realizar el reclutamiento de pacientes, colocación de la vacuna y toma de muestras.

En el laboratorio de Infectología del Departamento de Medicina Experimental de la UNAM se cuenta con un laboratorio que cuenta con una campana de bioseguridad clase II, una mesa de trabajo, una incubadora de CO₂ de doble cámara, una cosechadora de células, una bomba de vacío y un refrigerador para guardar isótopos radioactivos. Este equipo se utilizó para la realización de los ensayos de linfoproliferación. Una estudiante de maestría y un técnico de laboratorio participaron en el procesamiento de las muestras.

RESULTADOS

Población de estudio

Se reclutaron un total de 113 pacientes que recibieron la vacuna de sarampión por vía aerosol y subcutánea en forma aleatoria y que acudieron a las muestras subsecuentes posterior a la vacunación: 110 pacientes acudieron a los 3 meses y 71 a los 6 meses de los cuales 3 no acudieron a la segunda pero si a la tercera muestra. Del grupo aerosol, los padres de 8 niños no quisieron que siguieran participando, 8 fueron vacunados con la vacuna sarampión, rubéola, parotiditis (SRP) antes de la segunda muestra y 1 niño se fue a vivir a Acapulco quedando un total de 58 niños. Del grupo subcutáneo, 11 niños no regresaron, 8 recibieron la vacuna SRP antes de la 2ª muestra y uno se fue a vivir a Toluca, quedando un total de 55 niños (Diagrama 2).



Diagrama 2. Reclutamiento de pacientes, causas de abandono y población de estudio final.

No se encontraron diferencias en las características demográficas de la población de estudio como se muestra en la siguiente tabla 1:

	Vía Aerosol N = 58	Vía Subcutánea n = 55	P
Femenino	25	28	
Masculino	33	27	0.40
Edad (meses)	8.88 \pm 0.33	8.94 \pm 0.4	0.6
Peso (kg)	8.0 \pm 0.12	8.22 \pm 0.10	0.17
Talla (cm)	70.43 \pm 0.34	70.75 \pm 0.31	0.5

Tabla 1. Características demográficas de la población en estudio.

Respuesta inmune celular

En la respuesta inmune celular medida mediante la técnica de timidina tritiada, el porcentaje de linfoproliferación específica contra sarampión aumentó de 0% antes de la vacunación en ambos grupos, a 45% en el grupo aerosol comparado con 55% del grupo subcutáneo ($p=0.25$) a los 3 meses y a 60% en el grupo aerosol comparado con 59% en el grupo subcutáneo ($p=0.91$) a los 6 meses.

El índice de estimulación (IE) prevacunación aumentó de ($x \pm EE$) 1.33 \pm 0.008 en el grupo aerosol comparado con 1.35 \pm 0.008 en el grupo subcutáneo ($p=0.9$), a 4.38 \pm 0.63 en el grupo aerosol comparado contra 5.76 \pm 0.87 en el grupo subcutáneo ($p=0.2$) a los 3 meses y aumentó a 7.91 \pm 2.05 en el grupo aerosol comparado con 6.74 \pm 1.65 del grupo subcutáneo ($p=0.66$) a los 6 meses. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo aerosol

y subcutáneo en el porcentaje o el IE. Sin embargo, si se observó un aumento en el IE del grupo aerosol después de recibir el refuerzo con SRP a los 6 meses ($p=0.04$) (Figura 1). No se observaron diferencias en el porcentaje de respuesta ($p= 0.41, 0.94$ y 0.64) o el IE ($p=0.5, 0.6$ y 0.27) de MNSP estimulados con toxoide tetánico antes, a los 3 y 6 meses después respectivamente entre los grupos aerosol y subcutáneo.

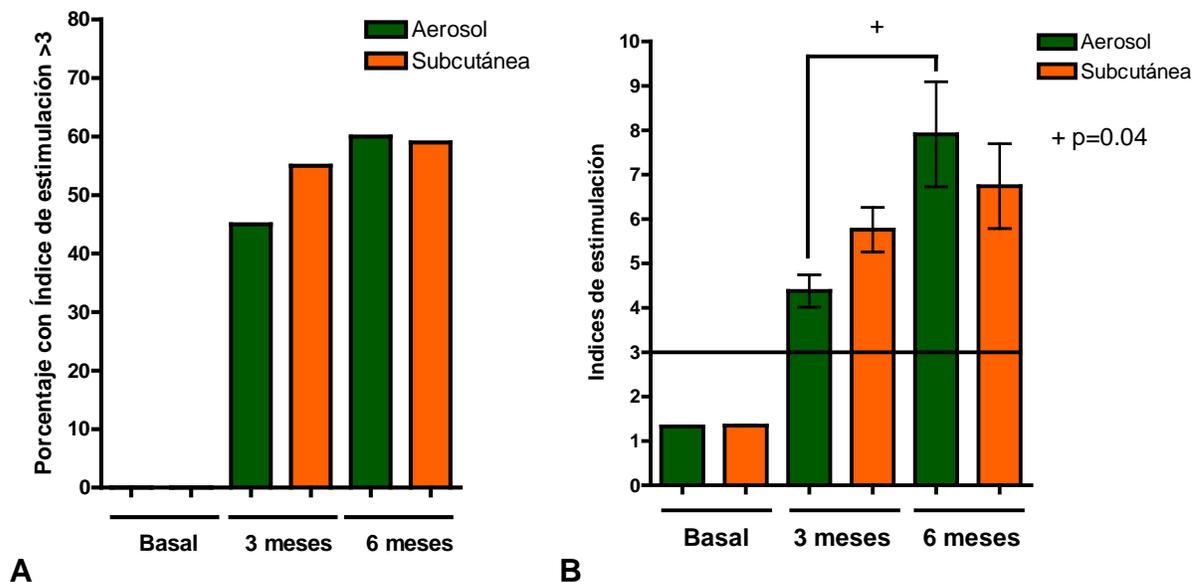


Figura 1. Linfoproliferación específica medida mediante timidina tritiada. A) No hay diferencias en el porcentaje de respuesta entre el grupo aerosol y subcutáneo a los 3 y 6 meses postvacunación ($p=0.25$ y 0.91 respectivamente). **B)** Se observa un aumento en el IE a los 3 y 6 meses, no se observan diferencias entre los grupos ($p=0.20$ y 0.66 respectivamente). Se observa un aumento entre los 3 y 6 meses en el grupo aerosol ($p=0.04$). La línea indica un índice de estimulación positivo para sarampión.

En la respuesta inmune celular medida mediante tinción con anticuerpos monoclonales contra marcadores externos celulares y citometría de flujo para medir la expansión de las poblaciones celulares específicas, se observó un aumento del número de linfocitos T CD4+ y T CD8+ de memoria con los

marcadores de superficie CCR7- CD62L-. Antes de la vacunación se observó una mayor frecuencia de linfocitos TCD8+ CCR7- CD62L- de ($x \pm EE$) 11.25 ± 1.10 en el grupo aerosol comparado con 7.54 ± 0.72 del grupo subcutáneo ($p=0.008$), con un aumento a 25.48 ± 2.95 en el grupo aerosol comparado con 18.56 ± 1.72 del grupo subcutáneo ($p=0.04$) a los 3 meses después de la vacunación, siendo mayor la frecuencia en el grupo aerosol y a los 6 meses incrementa a 23.53 ± 2.48 en el grupo aerosol comparado con 19.44 ± 1.54 en el grupo subcutáneo ($p=0.17$), en donde ya no se observa diferencia en la media entre los grupos aerosol y subcutáneo (Figura 2A).

En la población de linfocitos T CD4+ CCR7- CD62L- se observa una frecuencia de ($x \pm EE$) 1.41 ± 0.17 en el grupo aerosol comparado con 1.03 ± 0.009 del grupo subcutáneo ($p=0.06$) antes de la vacunación, y aumenta a 7.60 ± 1.8 en el grupo aerosol comparado con 10.14 ± 1.68 del grupo subcutáneo ($p=0.3$) a los 3 meses, y aumenta a 9.4 ± 0.76 en el grupo aerosol comparado con 9.92 ± 1.04 en el grupo subcutáneo ($p=0.6$) a los 6 meses. No se observan diferencias entre los grupos (Figura 2B).

Otro marcador que se ha mencionado como de memoria en la literatura es CD27 que es una molécula co-estimuladora en linfocitos TCD4+ el cual se asocia a la generación de memoria. Se hizo el análisis para linfocitos T CD4+ y para T CD8+. En éste estudio observamos que las frecuencias de la población de linfocitos TCD8+ asociados a CD27+ fue siempre menor en el grupo aerosol comparado con el grupo subcutáneo siendo la frecuencia de ($x \pm EE$) 75 ± 5.71 comparado con 94.7 ± 0.75 en el grupo subcutáneo ($p=0.002$) antes de la vacunación; 81.11 ± 2.50 en el grupo aerosol comparado con 86.62 ± 1.17 en el

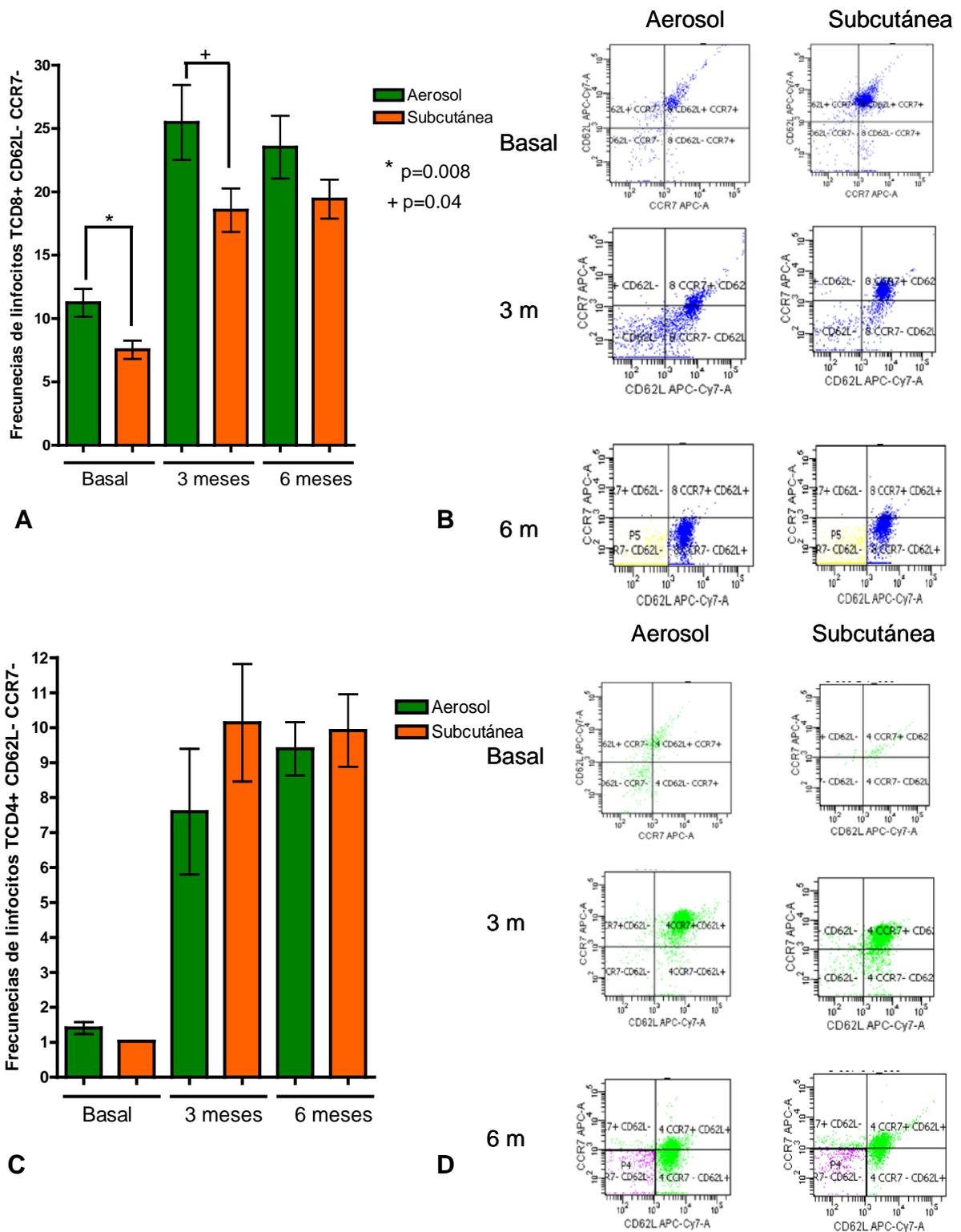


Figura 2. Linfocitos T de memoria. A) Se observa un aumento en la población de linfocitos T CD8+ CCR7- CD62L- a los 3 y 6 meses después de la vacunación, siendo la población mayor en el grupo aerosol a los 3 meses. **C)** Se observa un aumento de T CD4+ CCR7- CD62L- a los 3 y 6 meses postvacunación, sin diferencias entre el grupo aerosol y subcutáneo. **B y D)** Plots representativos de un paciente.

grupo subcutáneo ($p=0.04$) a los 3 meses y 84.96 ± 2.14 en el grupo aerosol comparado con 90.09 ± 1.17 en el grupo subcutáneo ($p=0.04$) a los 6 meses después de la vacunación (Figura 3).

En la población de linfocitos TCD4+ CD27+ se observaron frecuencias de ($x \pm EE$) 80.08 ± 6.03 en el grupo aerosol comparada con 97.49 ± 0.23 del grupo subcutáneo ($p=0.007$) antes de la vacunación; 87.35 ± 2.05 en el grupo aerosol comparado con 86.41 ± 1.64 en el grupo subcutáneo ($p=0.7$) a los 3 meses después de la vacunación y 88.07 ± 1.26 en el grupo aerosol comparado con 87.42 ± 2.14 del grupo subcutáneo ($p=0.7$) a los 6 meses después de la vacunación (Figura 3).

En las poblaciones de linfocitos TCD8+ CD45RA+ no se observan cambios antes y después de la vacunación, ni existen diferencias entre los grupos. Las frecuencias son de ($x \pm EE$) 99.2 ± 0.15 en el grupo aerosol comparado con 99.13 ± 0.29 en el grupo subcutáneo ($p=0.8$) antes de la vacunación y 90.33 ± 1.42 en el grupo aerosol comparado con 93.22 ± 1.07 en el grupo subcutáneo ($p=0.11$) a los 3 meses postvacunación (Figura 4A).

En las poblaciones de linfocitos TCD4+ CD45RA+ tampoco se observan cambios en las frecuencias después de la vacunación, ni diferencias entre los grupos. Las frecuencias son de ($x \pm EE$) 96.78 ± 0.45 en el grupo aerosol comparado con 95.98 ± 0.53 en el grupo subcutáneo ($p=0.2$) y de 86.61 ± 2.02 en el grupo aerosol comparado con 84.48 ± 2.38 en el grupo subcutáneo ($p=0.4$) a los 3 meses después de la vacunación (Figura 4B).

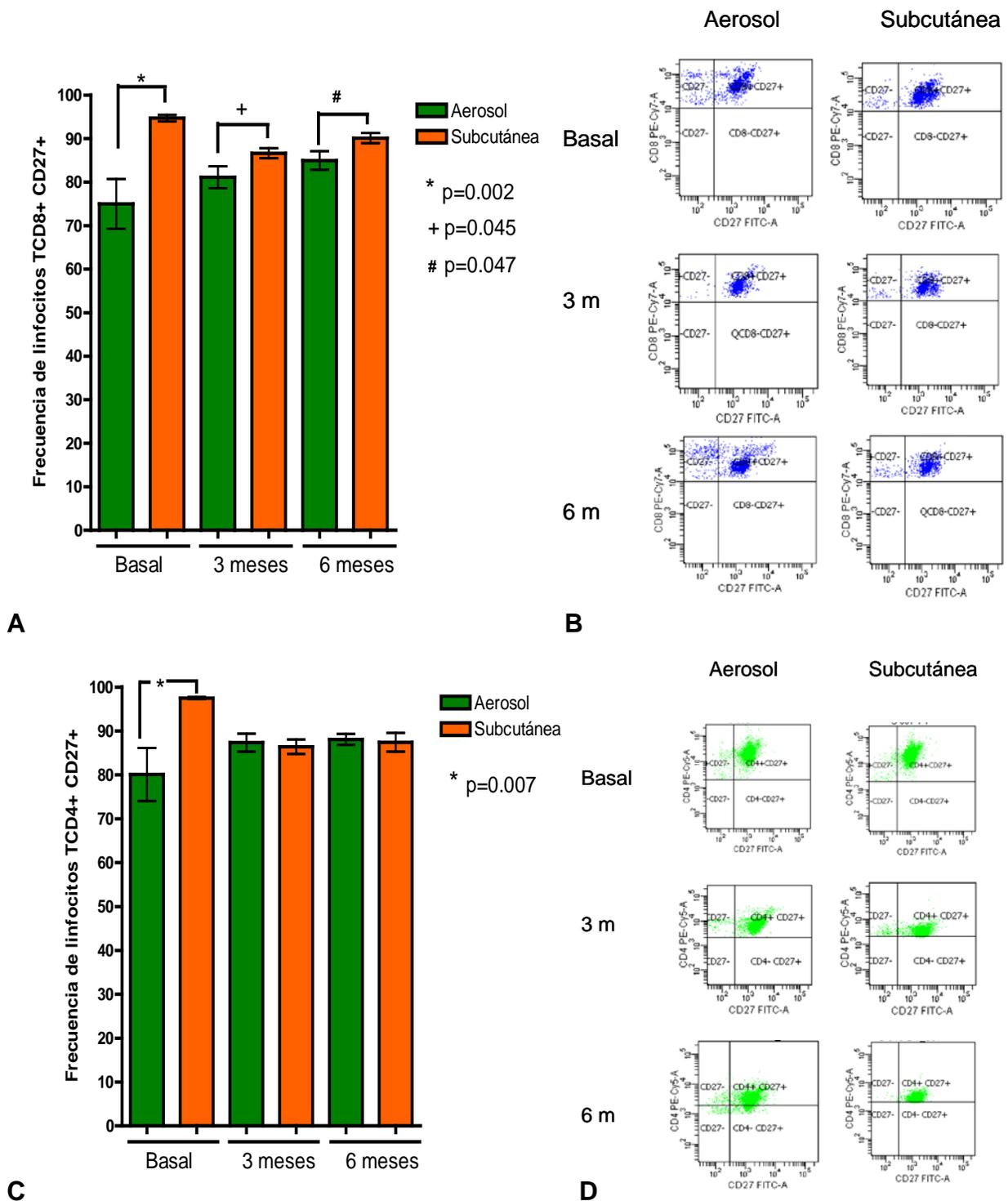


Figura 3. Linfocitos T CD8+ y CD4+ CD27+. **A)** Se observa una mayor frecuencia de linfocitos T CD8+ CD27+ en el grupo subcutáneo antes y a los 3 y 6 meses después de la vacunación. **C)** No se observan cambios en la frecuencia de linfocitos TCD4+ CD27+ antes y después de la vacunación. Solo se observa una mayor frecuencia en el grupo subcutáneo antes de la vacunación. **B y D)** Plots representativos de un paciente.

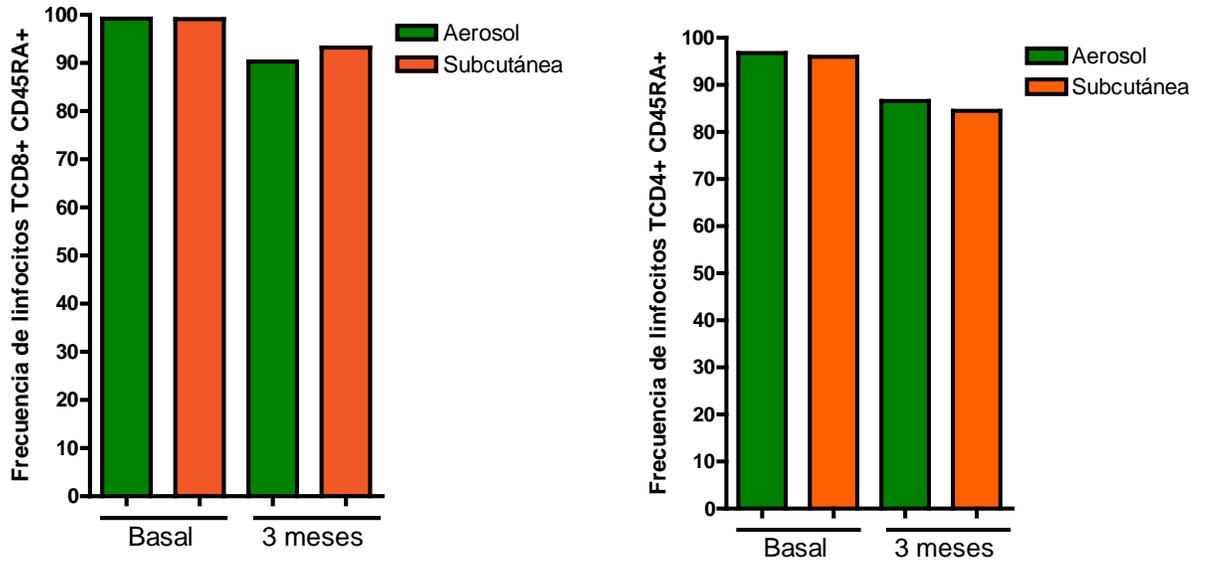


Figura 4. Linfocitos CD45RA+. No se observan diferencias ni cambios en la molécula CD45RA antes ni después de la vacunación en linfocitos T CD8+ (A), sin embargo en los TCD4+ (B) se observa una ligera disminución a los 3 meses postvacunación.

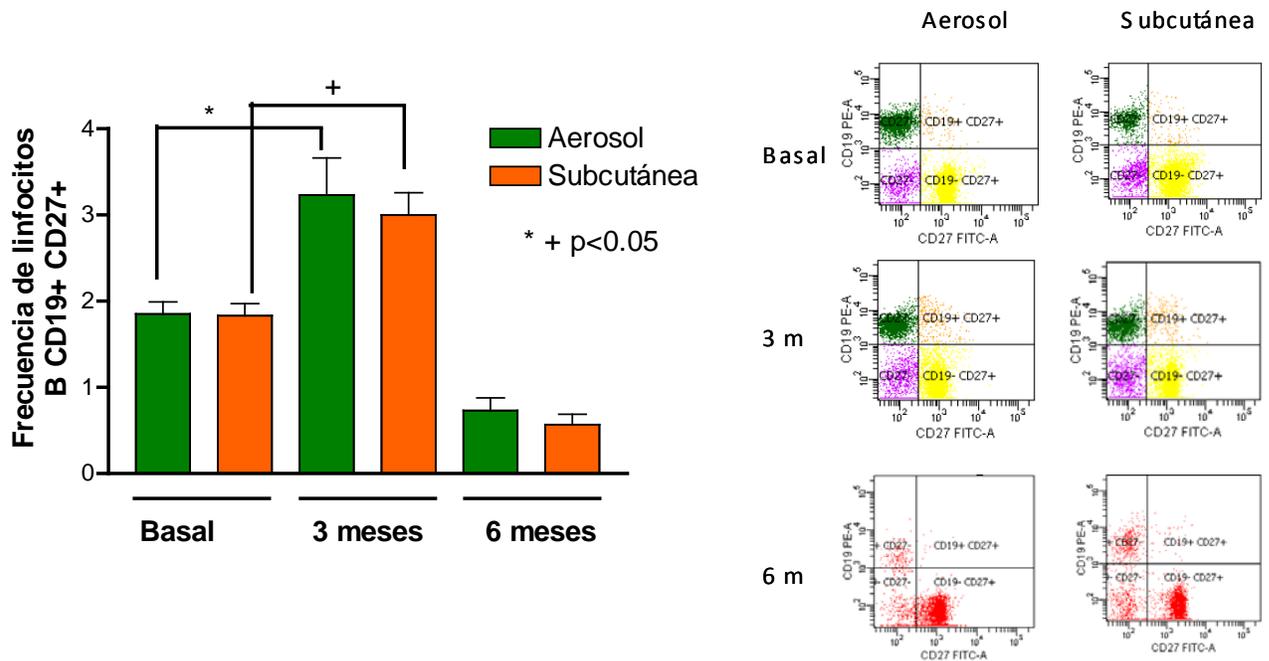


Figura 5. Linfocitos B de memoria. A) Se observa un aumento en linfocitos CD19+ CD27+ a los 3 meses después de la vacunación y una disminución a los 6 meses. B) Se muestran los resultados de un paciente representativo antes, 3 y 6 meses después de la vacunación.

La población de linfocitos B de memoria se caracteriza por 2 marcadores de superficie CD19+ para linfocitos B y CD27+ como B de memoria. En este estudio encontramos un aumento de los linfocitos B de memoria a los 3 meses después de la vacunación tanto en el grupo aerosol como en el grupo subcutáneo (prevacunación vs 3 meses y 3 meses vs 6 meses, $p=0.000$), sin embargo a los 6 meses se observa una disminución. No se observan diferencias entre el grupo aerosol y subcutáneo. Las frecuencias de células B de memoria son ($\bar{x}\pm EE$) 1.85 ± 0.014 en el grupo aerosol comparado con 1.84 ± 0.14 en el grupo subcutáneo ($p=0.9$) antes de la vacunación; 3.23 ± 0.43 en el grupo aerosol comparado con 3.0 ± 0.26 en el grupo subcutáneo ($p=0.6$) a los 3 meses y 1.43 ± 0.3 en el grupo aerosol comparado con 1.43 ± 0.33 en el grupo subcutáneo ($p=0.99$) a los 6 meses después de la vacunación (Figura 5).

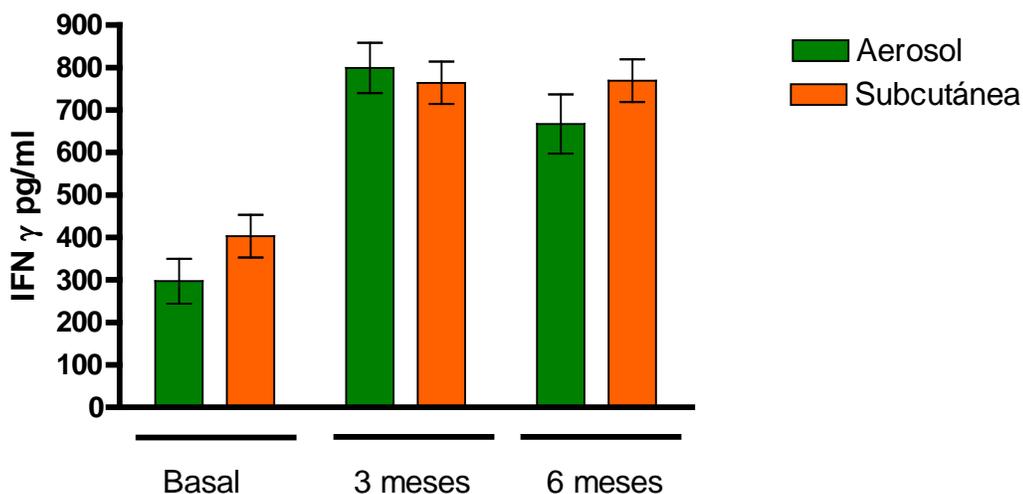


Figura 6. Niveles de interferón gama en sobrenadantes de MNSP estimulados con sarampión. Se observa un incremento en los niveles de $IFN\gamma$ a los 3 y 6 meses después de la vacunación. No se observan diferencias entre los grupos ($p=0.28$ antes, 0.94 a los 3 y 0.12 a los 6 meses).

Se observó un aumento en los niveles de interferón gama en los sobrenadantes de mononucleares en cultivo estimulados con antígeno de sarampión a los 3 y 6 meses después de la vacunación, sin embargo no se observaron diferencias entre ambos grupos. Los niveles fueron en el grupo aerosol ($\bar{x} \pm EE$) 403 ± 50 pg/mL comparado con 297 ± 53 pg/mL del grupo subcutáneo ($p=0.28$); 764 ± 50 y 799 ± 59 en el grupo aerosol comparado con 769 ± 50 y 667 ± 70 en el grupo subcutáneo a los 3 y 6 meses respectivamente ($p=0.94$ y 0.12) (Figura 6).

Respuesta inmune humoral

En la respuesta inmune humoral, a los 3 meses después de la vacunación no se observaron diferencias en la seroconversión que fue del 95% en el grupo aerosol comparado con 91% en el grupo subcutáneo ($p=0.43$). Ambos grupos recibieron al año de edad la vacuna triple viral (sarampión, rubeola, parotiditis) y 3 meses después de la aplicación de la triple viral la seropositividad fue de 100% tanto para el grupo aerosol como el subcutáneo (Figura 7A). Tampoco se observaron diferencias en los títulos medios geométricos antes de la vacunación, a los 3 ni a los 6 meses después de la vacunación. En el grupo aerosol los títulos medios geométricos fueron 4 (IC 95% 3-4) antes de la vacunación, 373 (IC 95% 441-843) a los 3 meses y 1528 (IC 95% 1470-2398) a los 6 meses después de la inmunización comparado con 4 (IC95% 3-6) antes de la vacunación, 306 (IC 95% 367-597) a los 3 meses y 1214 (IC 95% 1160-2193) 6 meses posteriores a la vacunación ($p= 0.47, 0.14, 0.49$, respectivamente) (Figura 7 B).

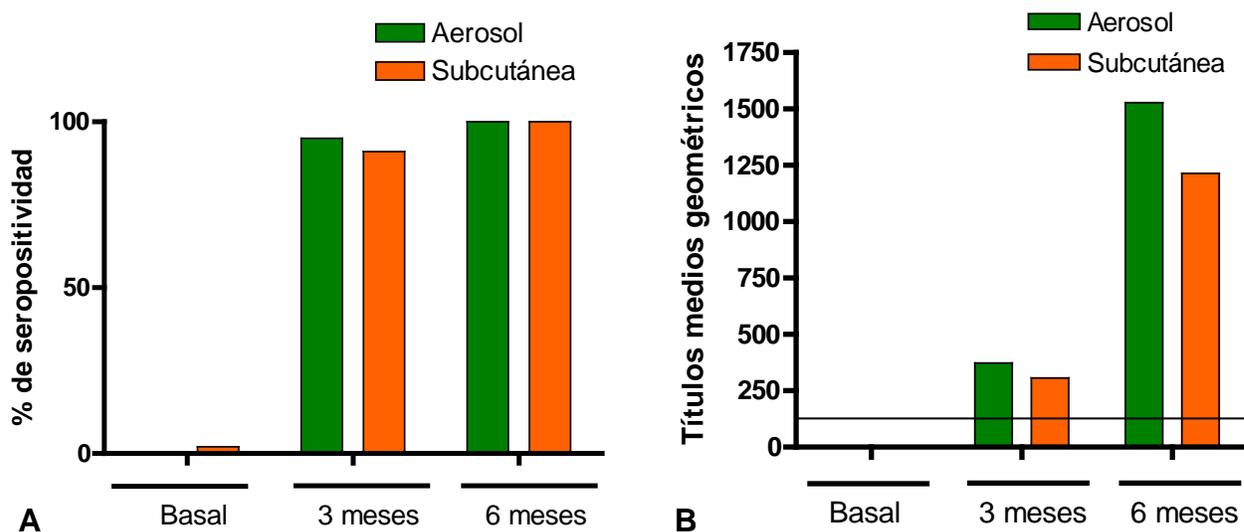


Figura 7. Respuesta inmune humoral. A) No hay diferencias en la seroconversión entre el grupo aerosol y subcutáneo a los 3 y 6 meses postvacunación. **B)** Se observa un aumento en los TMG a los 3 y 6 meses, no se observan diferencias entre los grupos. La línea indica un nivel protector (≥ 120).

Respuesta adaptativa

Se realizó el análisis para evaluar la respuesta humoral y su relación con la respuesta celular con base en un título protector ≥ 120 y un IE positivo ≥ 3 , encontrando 4 patrones de respuesta inmune (Tabla 2). A los 3 meses después de la vacunación encontramos respuesta celular y humoral en 43% del grupo aerosol y 48% del grupo subcutáneo, solo detectamos anticuerpos en ausencia de respuesta celular en 52% del grupo aerosol y 43% del grupo subcutáneo, encontramos solo respuesta celular en ausencia de detección de anticuerpos en 2% del grupo aerosol comparado con 7% del grupo subcutáneo y no se encontró ninguna respuesta en 3% del grupo aerosol y 2% del grupo subcutáneo. No se observaron diferencias entre los grupos aerosol y subcutáneo.

	Aerosol n=58	Subcutánea n=55	p
Respuesta humoral y celular	43%	48%	0.52
Respuesta humoral	52%	43%	0.15
Respuesta celular	2%	7%	0.38
Ninguna respuesta	3%	2%	0.59

Tabla 2. Respuesta adaptativa

Efectos temporalmente asociados a vacunación

En general las 2 vías de administración fueron bien toleradas, no se reportaron efectos adversos graves ni hospitalizaciones.

En el análisis de intención de tratar la mayor frecuencia de efectos temporalmente asociados a vacunación fue de rinorrea en 38% del grupo aerosol comparado con 40% en el grupo subcutáneo, seguido de tos en 26% del grupo aerosol comparado con 26% en el subcutáneo, fiebre en 21% del grupo aerosol comparado con 17% en el subcutáneo, diarrea en 17% del grupo aerosol comparado con 17% del subcutáneo, conjuntivitis en 9% del grupo aerosol comparado con 6% en el subcutáneo, exantema en 5% del grupo aerosol comparado con 10% del grupo subcutáneo, artralgias en 1% del grupo aerosol que no fueron reportadas en el grupo subcutáneo, y otros síntomas en 2% del grupo aerosol comparado con 4% del grupo subcutáneo. Otros incluyen 2 pacientes con vómito en cada grupo y uno con hipo en el grupo subcutáneo.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los efectos secundarios entre el grupo aerosol y subcutáneo (tabla 3).

	Aerosol n=75	Subcutánea n=75	p
Fiebre n (%)	16 (21)	13 (17)	0.53
Exantema n (%)	4 (5)	8 (10)	0.22
Conjuntivitis n (%)	7 (9)	5 (6)	0.42
Rinorrea n (%)	29 (38)	30 (40)	0.86
Tos n (%)	20 (26)	20 (26)	0.57
Diarrea n (%)	13 (17)	13 (17)	0.58
Artralgia n (%)	1 (1)	0	0.31
Otros n (%)	2 (2)	3 (4)	0.64

Tabla 3. Efectos temporalmente asociados a vacunación.

DISCUSION

La respuesta inmune humoral en niños que reciben la vacuna de sarampión en aerosol ha sido demostrada en diversos estudios clínicos. Los porcentajes de seroconversión varían de estudio a estudio, pero en general se reporta de 40% a 100% ^{7, 12-32}. Los estudios realizados en niños escolares que reciben la vacuna como refuerzo muestran una excelente respuesta anamnésica de seroconversión y seropositividad ²⁸ y cuando se aplica la misma dosis como inmunización primaria en niños de 12 meses la respuesta es similar a la vía subcutánea ²⁹. Sin embargo, cuando se aplica la misma cepa vacunal de sarampión en aerosol y a la misma dosis que estudios previos como dosis primaria en niños de 9 meses la respuesta es inferior ³¹. Analizando los resultados y las condiciones de inmunización hemos formulado la hipótesis de que la respuesta inmune humoral (medida mediante seroconversión y títulos medios geométricos) y celular (medida mediante porcentaje de respuesta celular e índice de estimulación) mejoraría si se hicieran cambios técnicos como cambiar el aparato para incrementar la cantidad de aerosol que se administra al niño o incrementar la dosis aplicada al niño mediante incremento de la potencia o del tiempo de exposición.

En éste estudio se utilizó la vacuna de sarampión Edmonston Zagreb fabricada por el Instituto del Suero de la India con una potencia comprobada por el CAYACC (Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura) en la ciudad de México de $10^{3.85}$ en 0.5 mL.

Algunos expertos en el tema han discutido acerca de la dosis que sería óptima, y sugieren que el frasco que contiene 10 dosis que se diluye

normalmente en 5 mL, se diluya en 2 mL para incrementar la cantidad de partículas virales (comunicación verbal).

De acuerdo con éste concepto las partículas contenidas en 10 dosis de una vacuna con la potencia que utilizamos en éste estudio son 70,794 partículas virales. Se ha calculado que la dosis aplicada en 30 segundos equivale a 0.1 mL. Si las 10 dosis se diluyen en 2 mL, 0.1 mL equivalen a 3,539 partículas virales. De éstas el 20% es inhalado por el niño, por lo que al final quedarían 707 partículas virales inhaladas. Esta cantidad de partículas es muy parecida a la utilizada en el estudio previo en niños de 9 meses en el que solo hubo un 33% de seroconversión (646), por lo que en éste estudio decidimos cambiar la estrategia.

Utilizando la vacuna de acuerdo a las especificaciones del fabricante (dilución de 10 dosis en 0.5 mL), incrementamos el tiempo de exposición al aerosol con base en el supuesto de que un niño que se encuentra inhalando una nebulización, en el momento que llora tiene de 5 a 10 segundos de apnea antes de una inspiración profunda; si solo se pone la vacuna por 30 segundos entre 1 y 2 terceras partes de la vacuna no se inhalan. Por el contrario, si se aplica 2 minutos y medio el niño tendrá varias oportunidades de inhalar y durante el llanto la inhalación es más profunda.

De acuerdo a los cálculos, una vacuna con la potencia ya mencionada aplicada por 2 minutos y medio equivalen a 0.5 mL por lo que se aplican en la vacuna 7,079 partículas virales, de los cuales el 20% es inhalado por el niño, por lo que al final entran al organismo aproximadamente 1,415 partículas virales. La recomendación de la vacuna de sarampión es que contenga por lo

menos 1000 partículas virales al final de la fecha de expiración para producir una buena respuesta inmune protectora, siendo 20 partículas virales suficientes para producir una respuesta inmune en individuos susceptibles³⁷; por lo que la dosis aplicada en ésta forma daría resultados equivalentes o mejores en la respuesta inmune humoral y celular que la vacuna aplicada por vía subcutánea.

En éste estudio incrementamos la dosis mediante una mayor exposición al aerosol, en lugar de exponer al niño 30 segundos como se ha realizado en los estudios previos con buenas respuestas de seroconversión, se expuso al niño durante 2 minutos y medio, tratando de incrementar el tiempo de inhalación del inóculo.

Respuesta inmune a la vacunación con sarampión en aerosol

Tradicionalmente la respuesta inmune a la vacunación con sarampión se mide mediante la respuesta humoral, y son los anticuerpos neutralizantes medidos mediante la técnica de neutralización de reducción en placa los más sensibles para definir protección a largo plazo (>120 mUI/mL)⁶¹. Sin embargo, en el caso de las infecciones virales la respuesta celular también juega un papel muy importante, y en el caso específico de las vacunas la respuesta celular de memoria. Una metodología ampliamente utilizada y aceptada en el ámbito científico para medir la respuesta celular desde los 80's ha sido la linfoproliferación específica con timidina tritiada, ésta metodología solo mide linfoproliferación específica a un antígeno, pero no da información de las células

que proliferan. En éste estudio diseñamos una metodología para detectar cuáles son las células que están proliferando específicamente después de la vacunación con sarampión y medimos las células con marcadores de memoria periférica. Este es el primer estudio que detecta este tipo de células de memoria en respuesta a la vacuna de sarampión en aerosol.

Respuesta inmune celular

No se observaron diferencias entre los grupos aerosol y subcutáneo en la respuesta celular, ni en el porcentaje de niños que presentaron una respuesta celular medida mediante linfoproliferación específica contra sarampión utilizando timidina tritiada, a los 3 meses ni a los 6 meses después de la vacunación. Lo que sugiere que el aumento de la exposición por vía aerosol produce una respuesta inmune celular equivalente a la vía subcutánea.

Debido a que la metodología que hemos utilizado en estudios previos detecta la proliferación específica contra sarampión, pero no nos permitía definir qué células son las que estaban dando esta respuesta, desarrollamos una metodología para detectar si éstas células que estaban proliferando eran linfocitos T CD4+ o CD8+ de memoria ⁴¹. De acuerdo a estudios previos, la respuesta inmune específica a antígeno medida in vitro se da aproximadamente entre 5 y 7 días, por lo que en éste caso se co-cultivaron in vitro los MNSP de los niños con el antígeno de sarampión para observar una linfoproliferación. Se marcaron éstas células con marcadores de células T de memoria central y efectora ya descritos anteriormente que se habían utilizado para respuesta a vacuna de influenza con tetrámeros ⁶². En éste caso nosotros detectamos un

aumento de las células T CD4⁺ y T CD8⁺ CCR7⁻ y CD62L⁻ que se describen como células T de memoria periférica, las cuales no tienen éstos marcadores de migración a tejidos linfoides y que se encuentran en la periferia listos para proliferar en caso de un nuevo contacto con el antígeno ⁴¹.

Cuando se midieron las poblaciones de células de memoria encontramos que existe un incremento en las poblaciones de células T CD8⁺ de memoria periférica (CCR7⁻ CD62L⁻) 3 y 6 meses después de la vacunación, observamos una respuesta mayor en el grupo aerosol a los 3 meses, sin embargo a los 6 meses la respuesta es igual en ambos grupos después de que recibieron el refuerzo con la SRP. Contrario a lo que se ha encontrado en los linfocitos T CD4⁺ de memoria (CCR7⁻ CD62L⁻) en los que se observa un aumento en las poblaciones después de la vacunación, pero no hay diferencias entre los grupos aerosol y subcutáneo. A los 6 meses la respuesta es igual después de la revacunación con SRP en donde observamos el efecto de la respuesta de refuerzo; sin embargo a los 3 meses, éste estudio sugiere que se producen más linfocitos TCD8 de memoria en el grupo aerosol.

Las poblaciones celulares CD8⁺ CD27⁺ fueron siempre menores en el grupo aerosol antes y después de la vacunación, en los CD4⁺ CD27⁺ no se observaron diferencias. El marcador CD27⁺ se ha asociado a la generación de células de memoria en los linfocitos T CD4⁺ ^{42, 63}, y en linfocitos T CD8⁺ se asocia al desarrollo de células T CD8⁺ de memoria mediante la prevención de apoptosis y estimulación de células T CD8⁺ vírgenes ^{42, 63, 64}. Desde el inicio del estudio se observa una menor cantidad de células TCD8⁺ CD27⁺ antes de la

aplicación de la vacuna, por lo que no se atribuye éste fenómeno a la vacunación por aerosol.

Cuando medimos el marcador CD45RA no se observaron diferencias entre los grupos antes ni después de la vacunación. Este marcador solo, se asocia a células vírgenes que no han estado en contacto previo con otros antígenos, éste hallazgo es esperado ya que siempre existe una cantidad de células vírgenes circulantes en sangre periférica en los sujetos y la vacunación no afecta a éstas poblaciones si se hacen mediciones en el tiempo. Si se hubiera medido en el momento de la vacunación probablemente esta población hubiera disminuido su tamaño debido a que adquieren el marcador CD45RO que es un marcador de activación y memoria. En un estudio reportado en la literatura, CD45RA junto con CCR7⁻ clasifica a los linfocitos T CD8⁺ en: vírgenes cuando tienen CD45RA⁺ CCR7⁺, efectores CD45RA⁻ CCR7⁻, memoria central cuando tienen CD45RA⁻ CCR7⁺, memoria efectora CD45RA⁻ CCR7⁻ y memoria efectora activada RA CD45RA⁺ CCR7⁻ ⁶⁵. Se intentó realizar el análisis de las subpoblaciones de CD8⁺ CCR7⁻ y CD45RA, pero cuando se abrieron las ventanas para CD8, CCR7⁻ y CD45RA la frecuencia de las poblaciones fue muy baja o casi nula, por lo que no se pudo analizar éste tipo de población.

La población de linfocitos B de memoria se caracteriza por 2 marcadores de superficie CD19⁺ para linfocitos B y CD27⁺ como B de memoria ⁴³. En este estudio encontramos un aumento de los linfocitos B de memoria a los 3 meses después de la vacunación tanto en el grupo aerosol como en el grupo

subcutáneo, sin embargo a los 6 meses se observa una disminución. No se observan diferencias entre el grupo aerosol y subcutáneo. Esta disminución a los 6 meses podría estar condicionada por un mayor número de células B de memoria que al ser estimuladas por el antígeno de sarampión se diferencien en células plasmáticas para la producción de anticuerpos, ésta teoría podría haberse corroborado si éstas células estimuladas con sarampión por 5 días también se hubieran teñido con anticuerpos monoclonales contra CD138 SYNDECAN I para detectar células plasmáticas ⁵⁰, sin embargo como éste hallazgo se encontró después de teñir y medir las frecuencias celulares de toda la población de estudio, no fue posible medir éstas poblaciones de células plasmáticas.

Las concentraciones de IFN- γ liberado por células T estimuladas con antígeno de sarampión in vitro no fueron diferentes cuando se midió ésta citocina en cada uno de los grupos para medir la inmunidad específica de células T contra sarampión.

Estos resultados apoyan el concepto de que el aumento de la dosis produce una respuesta inmune celular equivalente al grupo subcutáneo e incluso generan más células TCD8+ de memoria 3 meses después de la vacunación.

Respuesta inmune humoral

Aun cuando no hay diferencias estadísticamente significativas, hay una tendencia a una mayor seroconversión en el grupo aerosol (95%) comparado

con el subcutáneo que fue de 91%. Este porcentaje de seroconversión en el grupo aerosol, es comparable con porcentajes de respuesta previamente descritos al aplicar la vacuna de sarampión en aerosol en niños de 9 meses en los que usan una potencia de la vacuna más alta ($10^{5.2}$ y $10^{4.5}$)^{17, 23} y es mayor que el estudio previo en niños de 9 meses que recibieron el aerosol en el que se reporta 33% de seroconversión³¹. Esto corrobora que es necesario utilizar una dosis mayor para inmunizar niños de 9 meses por el método de aerosol, ya que en 12 meses la seroconversión (91%) fue adecuada con una dosis menor. A los 6 meses después de la vacunación, el 100% de los niños presentan una seropositividad a sarampión, 3 meses después de recibir su refuerzo con SRP por vía subcutánea. Este aumento en la seropositividad es el efecto de refuerzo con la dosis de sarampión que se aplica 3 meses después³⁷.

Los TMG fueron equivalentes a los 3 y 6 meses en el grupo aerosol y subcutáneo, corroborando la buena respuesta humoral a una dosis mayor de aerosol en niños de 9 meses. A los 6 meses incrementaron significativamente los TMG en ambos grupos como respuesta a la dosis de refuerzo que recibieron los niños al año de edad mediante la SRP.

Fernández de Castro reportó 100% de seroconversión en niños de 9 meses que recibieron la vacuna en aerosol, quienes recibieron una dosis de $10^{4.5}$ TCID₅₀ por 0.5 mL, con una dosis estimada retenida de 1,265 partículas virales²³. Esta cantidad de partículas virales fue alcanzada también en éste estudio mediante el incremento del tiempo de exposición del aerosol utilizando una vacuna con una potencia menor, siendo el cálculo de aproximadamente de 1,415 partículas virales inhaladas.

Inducción de respuesta adaptativa a la vacuna de sarampión

De acuerdo a los estudios previos de la respuesta inmune a la vacuna de sarampión en aerosol en donde se analiza la respuesta adaptativa con base en el patrón de los títulos de anticuerpos y su relación con el índice de estimulación se encontraron 4 patrones de respuesta inmunológica:

Primer patrón: respuesta de anticuerpos protectora con respuesta celular positiva. Esta respuesta se encontró en 43% del grupo aerosol y 48% del grupo subcutáneo ($p=0.52$). Este patrón de respuesta sugiere que se está estimulando tanto la respuesta Th1 como la respuesta Th2 al antígeno vacunal, en la misma proporción en el grupo aerosol como subcutáneo.

Segundo patrón: una respuesta humoral con títulos protectores de anticuerpos, con respuesta celular negativa. Esta respuesta se encontró en 52% del grupo aerosol y en 43% del grupo subcutáneo ($p=0.38$). Este es un patrón de respuesta que ha sido descrita en estudios previos en niños que se han vacunado con la vacuna de sarampión por vía subcutánea y en los que se detecta en mayor proporción la respuesta humoral que la celular^{33, 34, 35}. Este patrón puede ser atribuido a la dificultad de detectar células T específicas contra sarampión en la sangre periférica de algunos vacunados, más que a una falla para desarrollar una respuesta inmune de células T específica.

Tercer patrón: respuesta de anticuerpos no protectores, con respuesta celular positiva. Esta respuesta se encontró en 2% del grupo aerosol y en 7% del grupo subcutáneo ($p=0.15$). Un pequeño número de reportes de casos y datos epidemiológicos limitados sugieren que algunos individuos están protegidos de la enfermedad natural aun con niveles bajos o indetectables de

anticuerpos en el momento de la exposición^{66, 67}. Hay evidencias que señalan que en algunas personas que son vacunadas contra sarampión puede haber una respuesta celular mayor o más duradera en ausencia de una respuesta humoral³⁴. La protección a largo plazo en presencia de inmunidad celular y ausencia de inmunidad humoral no se conoce, pero se ha sugerido que la respuesta celular juega un papel importante en la defensa del hospedero contra gérmenes intracelulares, incluyendo virus⁵⁰. Es probable que individuos con éste patrón tengan protección contra sarampión a pesar de tener títulos bajos de anticuerpos. Desafortunadamente en el presente estudio, el número de niños con este patrón es muy pequeño y no permite derivar conclusiones de las diferencias encontradas en torno a la vía de vacunación.

Cuarto patrón: una respuesta de anticuerpos nula o no protectora, con respuesta celular negativa. Esta respuesta se encontró en 3% del grupo aerosol comparado con 2% del grupo subcutáneo ($p=0.59$). En contraste con el estudio previo de aerosol en niños de 9 meses³¹ en el que 8% del grupo aerosol no tuvieron ninguna respuesta, en éste estudio con una mayor dosis sólo el 3% no respondieron y no hubo diferencias significativas con el grupo subcutáneo.

Este estudio mostró 4 patrones de respuesta inmune siendo las más frecuentes la inducción de ambas vías tanto humoral como celular y la inducción de anticuerpos en ausencia de respuesta celular. La ausencia de respuesta tanto humoral como celular se presentó en un pequeño porcentaje de ambas vías y en un pequeño porcentaje solo respuesta celular. Estos porcentajes coinciden con los estudios previos en 12 y 9 meses^{29, 31}. Aun

cuando todavía no sabemos el papel de la inmunidad celular en la protección contra la enfermedad a largo plazo, éste estudio sugiere que la medición de la respuesta celular es útil en la evaluación de la respuesta inmune a la vacuna de sarampión.

En éste estudio se muestra que la administración de la vacuna por vía aerosol induce células T específicas de memoria contra sarampión en niños, que se induce un patrón de respuesta inmune adaptativa en la misma magnitud que la vacuna administrada por vía subcutánea. Se corrobora que el aumento en el tiempo de exposición de la dosis administrada en aerosol produce una respuesta inmune humoral, celular y adaptativa equivalente al grupo subcutáneo.

Papel de los anticuerpos pasivos maternos en la inmunización por aerosol

El segundo objetivo del estudio fue comparar las respuestas celular y humoral en ambos grupos de acuerdo al nivel de anticuerpos pasivos maternos, sin embargo contrario a los estudios previos en donde se había reportado que 30% de hijos de madres vacunadas a los 9 meses presentan anticuerpos pasivos maternos⁵⁹, y en el estudio previo en niños de 9 meses a quienes se aplicó vacuna de sarampión en aerosol en donde sólo el 12% de la población tenía anticuerpos pasivos maternos³¹; en éste estudio solo el 2% del grupo subcutáneo presentó anticuerpos pasivos maternos y ningún niño del grupo aerosol presentó anticuerpos pasivos maternos, por lo que no fue posible hacer un análisis estratificado para ver si existen diferencias en la respuesta inmune

de acuerdo a la forma de inmunización en la presencia de anticuerpos pasivos maternos.

Respuesta a una segunda revacunación

De acuerdo a los estudios del grupo de Stanford, una primera dosis de sarampión antes del año de edad con un refuerzo al año incrementa la respuesta inmune ⁵¹, por lo que una de nuestras hipótesis era que debido a que la vacunación con sarampión en aerosol es muy potente, si ésta se aplicaba antes del año de edad aumentaría la respuesta al aplicar una segunda dosis de refuerzo en forma de triple viral (sarampión, rubeola y paperas) que se aplica a los 12 meses de edad. El tercer objetivo del estudio consistió en evaluar si la respuesta a una revacunación con sarampión era mayor en el caso del grupo de niños que fueron vacunados por la vía aerosol, sin embargo el porcentaje de niños con anticuerpos protectores e índice de estimulación positivo, así como los títulos medios geométricos y el índice de estimulación fueron comparables entre el grupo aerosol y subcutáneo a los 6 meses después de la vacunación inicial con sarampión y 3 meses después de que recibieron todos la SRP por vía subcutánea. En ambos grupos se observa el efecto de refuerzo tanto en la inmunidad humoral como celular de la vacuna SRP, sin embargo no se observan diferencias entre los grupos.

Inmunosupresión asociada a la vacunación

Se ha descrito inmunosupresión transitoria en caso de pacientes que padecen sarampión durante el primer mes después de la enfermedad ⁵²,

además de algunos pacientes vacunados ⁵⁶. En nuestro estudio no se observaron diferencias en las respuestas de linfoproliferación específica medidas mediante timidina tritiada contra toxoide tetánico, que es un antígeno bacteriano. Esta medición se planeó inicialmente pensando en que la vacuna pudiera tener algún efecto inmunosupresor, sin embargo no se observó ningún efecto supresor en la respuesta de linfoproliferación a un antígeno diferente al contenido en la vacuna de sarampión, ni al antígeno de sarampión en sí, ni se observaron diferencias en la respuesta entre el grupo aerosol y subcutáneo. Por lo que podemos concluir que la vacunación por vía aerosol o subcutánea no produjo inmunosupresión transitoria en nuestra población de estudio.

Efectos temporalmente asociados a vacunación

No se observaron diferencias en los efectos temporalmente asociados a la vacunación con la administración de la vacuna por ambas vías.

Los efectos secundarios fueron equivalentes en ambos grupos. Los efectos secundarios más frecuentemente encontrados fueron rinitis, tos, diarrea y fiebre, que coincide con los efectos secundarios más frecuentes encontrados en el estudio previo realizado en niños de 9 meses ³¹; sin embargo el porcentaje de niños afectados por estos efectos secundarios fue más bajo en éste estudio.

En general se concluye que el tiempo de exposición a la vacuna de sarampión en aerosol utilizado en éste estudio es bien tolerada en ésta población.

Finalmente, los resultados del presente estudio demostraron que se inducen respuestas de células T y/o respuestas humorales con niveles protectores de anticuerpos en la mayoría de los niños que reciben la vacuna en aerosol y que es importante incrementar el tiempo de exposición al aerosol en niños de 9 meses para poder obtener una respuesta equivalente a la administración subcutánea de la vacuna. Las ventajas principales de la vía de administración en aerosol podrían estar encaminadas a si es útil para inmunizar a niños menores de 12 meses de edad en donde la presencia de anticuerpos pasivos no permite una adecuada respuesta inmune al aplicar la vacuna por vía subcutánea y en quienes la respuesta inmune está menos desarrollada y es menor. La vacuna de sarampión administrada por vía aerosol puede tener ventajas prácticas (vacunación masiva, evita uso de jeringa y aguja, disminuye el riesgo de infecciones adquiridas por inyecciones) pero aun se necesita mayor evaluación.

CONCLUSIONES

Al aumentar el tiempo de exposición de la vacuna administrada por vía aerosol comparada con la vía subcutánea encontramos lo siguiente:

En la respuesta inmune celular medida por el método de incorporación de ³H-timidina se observa un aumento en el porcentaje de respuesta celular e índice de estimulación a los 3 y 6 meses después de la vacunación por ambos métodos de aplicación de vacuna. No se encontraron diferencias entre las dos vías de administración. Sin embargo, se observa un aumento a los 6 meses después de la vacunación con sarampión, 3 meses después de recibir el refuerzo con SRP en el grupo aerosol.

Mediante la técnica de citometría de flujo detectamos un aumento de los linfocitos T CD8+ y T CD4+ de memoria a los 3 y 6 meses después de la vacunación.

Se observó una mayor frecuencia de la población de los linfocitos T CD8+ de memoria efectora periférica (CCR7- CD62L-) en el grupo aerosol comparado con el subcutáneo a los 3 meses después de la vacunación. Sin embargo a los 6 meses no se observan diferencias significativas.

Se observa un aumento en las poblaciones de linfocitos B de memoria (CD19+ CD27+) a los 3 meses postvacunación, que disminuyen a los 6 meses, sin diferencias significativas entre las dos vías de administración.

No se observan diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de seroconversión ni en los títulos medios geométricos entre el grupo aerosol y subcutáneo.

Se observan 4 patrones de respuesta inmune adaptativa con base en los niveles de anticuerpos y su relación con la respuesta celular, siendo los más frecuentes ambas respuestas y respuesta humoral, menor frecuencia sólo respuesta celular o ninguna, mismos patrones que coinciden con los estudios previos. No se observan diferencias entre el grupo aerosol y subcutáneo.

No observamos diferencias en los efectos temporalmente asociados a vacunación entre el grupo aerosol y subcutáneo. El incremento en el tiempo de exposición a 2.5 minutos de la vacuna administrada por vía aerosol en niños de 9 meses es bien tolerada.

En resumen, encontramos que al aumentar la dosis administrada mediante la prolongación del tiempo de exposición a la vacuna de sarampión por vía aerosol respecto a dosis utilizadas en estudios previos en niños de 9 meses de edad, la respuesta inmune es equivalente a la de niños que reciben la vacuna por vía subcutánea. Demostramos por primera vez que la administración por mucosas de la vacuna de sarampión de virus vivos atenuados Edmonston Zagreb induce células T CD4+ y TCD8+ de memoria periférica específicas contra sarampión, así como células B de memoria específica contra sarampión. La dosis utilizada de vacuna de sarampión en aerosol es bien tolerada por niños de 9 meses.

BIBLIOGRAFIA

- 1) MMWR, December 4, 2009;58(47):1321-1326
- 2) World Health Organization. Global measles mortality reduction and regional elimination. WHO Weekly epidemiological record. 2002;77(7):49-56.
- 3) Nokes DJ, Anderson RM. Measles, mumps and rubella vaccine: what coverage to block transmission? Lancet 1988;2:1374.
- 4) Santos JI, Nakamura MA, Veras Gody M, Kuri P, Alvarez Lucas C, Tapia Conyer R. Measles in Mexico, 1941-2001: Interruption of endemic transmission and lessons learned. JID 2004;189 (suppl 1):S243-50.
- 5) Boletín de la Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/boletin.htm>
- 6) Feigin RD, Cherry JD. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. Ed WB Saunders Company. 4a. edición, 1998. pp: 2054-2074.
- 7) Fernández de Castro J, Kumate J. La vacunación contra el sarampión. Situación en México y América. Avances en el método de inmunización por aerosol. Bol Med Hosp Infant Mex 1990;47(7):449-461.
- 8) Black FL, Sheridan SR. Studies on an attenuated measles-virus vaccine. IV. Administration of vaccine by several routes. N Engl J Med 1960;263-165-9
- 9) Simasathien S, Migasena s, Bellini W, Samakoses R, Pitisuttitham P, Bupodom W, Heath J, Anderson L, Bennett . Measles vaccination of Thai infants by intranasal and subcutaneous routes: possible interference from respiratory infections. Vaccine 1997;15:329-33
- 10) Whittle H, Rowland MGM. Failure of measles vaccine sprayed into the oropharynx of infants. Lancet 1983;1045.
- 11) Ogra PL, Fishaut M, Gallagher MR. Viral vaccination via the mucosal routes. Rev Infect Dis 1980;2(3):352-369.
- 12) Cutts FT, Clements J, Bennett JV. Alternative routes of measles immunization: a review. Biologicals. 1997;25:323-338.
- 13) Okuno Y. Vaccination with egg passage measles virus by inhalation. Am J Dis Children 1962;103:211-214
- 14) Kress S, Schluederberg AE, Hornick RB, Morse LJ, Cole JL, Slaer EZ, St Joseph MO and McCrumb FD. Studies with live attenuated measles virus vaccine. II Clinical and immunologic response of children in an open community. Am J Dis Children 1961;101:57-63
- 15) McCrumb F, Bulkeley J, Hornick R et al. Clinical trials with living attenuated measles virus vaccines. Am J Public Health 1962;52:11-15
- 16) Teskikh II, Danilov AI, Shchelchov GI, Fadeeva LL, Khaletskaja E. Theoretical substantiation and effectiveness of immunization with aerosols of liquid measles vaccines [NIH library 80-439 translation from Russian]. Vestn Akad Med Nauk SSSR 1971;26:84-90
- 17) Sabin AB, Arechiga AM, Fernández de Castro J, Sever JL, Madden DL, Shekarchi I, Albrecht P. Successful immunization of children with and without maternal antibody by aerosolized measles vaccine. I. Different results with undiluted human diploid cell and chick embryo fibroblast

- vaccines. *J Am Med Assoc* 1983;249:2651-62
- 18) Sabin AB, Arechiga AF, Fernández de Castro J, Albrecht P, Sever JL, Shekarchi I. Successful immunization of infants with and without maternal antibody by aerosolized measles vaccine. II. Vaccine comparisons and evidence for multiple antibody response. *J Am Med Assoc* 1984;251:2363-71
 - 19) Sabin AB. Immunization against measles by aerosol. *Review Infect Dis* 1983;5:514
 - 20) Sabin AB, Albrecht P, Takeda AK, Ribeiro EM, Veronesi R. High effectiveness of aerosolized chick embryo fibroblast measles vaccine in seven-month-old and older infants. *J Infect Dis.* 1985;152(6):1231-1237.
 - 21) Whittle HC, Rowland MGM, Mann GF, Lamb WH, Lewis RA. Immunization of 4-6 month old Gambian infants with Edmonston-Zagreb measles vaccine. *Lancet* 1984;2:834-7
 - 22) Torigoe S, Biritwum RB, Isomura S, Kobune F, Mingle JA, Toba M, Antwi P, Ofosu-Amaah S. Measles in Ghana: a trial of an alternative means of administration of measles vaccine. *J Tropical Pediatrics* 1986;32:304-309.
 - 23) Fernández de Castro J, Valdespino Gomez JL, Díaz Ortega JL. Diploid cell measles vaccine. *JAMA* 1986;256(6):714.
 - 24) Khanum S, Uddin N, Garelick H, Mann G, Tomkins A. Comparison of Edmonston Zagreb and Schwarz strains of measles vaccine given by aerosol or subcutaneous injection. *The Lancet.* 1987:150-153.
 - 25) Ekwunwe EO. Immunization by inhalation of aerosolized measles vaccine. *Ann Trop Paediatrics.* 1990;10:145-149.
 - 26) Dilraj A, Cutts F, Fernandez de Castro J, Wheeler J, Brown D, Roth C, Coovadia H, Bennett J. Response to different measles vaccine strains given by aerosol and subcutaneous routes to schoolchildren: a randomized trial. *Lancet* 2000;355:798-803
 - 27) Fernández de Castro J, Kumate Rodríguez J, Sepúlveda J, Ramírez Isunza JM, Valdespino Gómez JL. La vacunación antisarampionosa en México por el método de aerosol. *Salud Pública de México.* 1997; 39(1):53-60.
 - 28) Sepúlveda Amor J, Valdespino Gómez JL, García García ML, Bennet J, Islas Romero R, Echaniz Aviles G, Fernandez de Castro J. A randomized trial demonstrating successful boosting responses following simultaneous aerosols of measles and rubella (MR) vaccines in school age children. *Vaccine* 2002;20:2790-2795.
 - 29) Wong Chew RM, Islas Romero R, García García ML, Beeler J, Audet S, Santos-Preciado JI, Gans H, Lew-Yasukawa L, Maldonado YA, Arvin AM, Valdespino-Gómez JL. Induction of cellular and humoral immunity after aerosol or subcutaneous administration of Edmonston-Zagreb measles vaccine as a primary dose to 12 month-old children. *JID* 2004;189:254-257
 - 30) Fernandez de Castro J, Bennett JV, Gallardo Rincon H, Alvarez y Muñoz MT, Partida Sánchez LAE, Santos-Preciado JI. Evaluation of

- immunogenicity and side effects of triple viral vaccine (MMR) in adults, given by two routes: subcutaneous and respiratory (aerosol). *Vaccine* 2005;23:1079-1084.
- 31) Wong-Chew RM, Islas-Romero R, García-García M de L, Beeler JA, Audet S, Santos-Preciado JI, Gans H, Lew-Yasukawa L, Maldonado YA, Arvin AM, Valdespino-Gómez JL. Immunogenicity of aerosol measles vaccine given as the primary measles immunization to nine month old mexican children. *Vaccine* 2006;24(5):683-90
 - 32) Bennett JV, Fernandez de Castro J, Martinez Poblete R, Garcia Alcantara ML, Gallardo Diaz E, Molina Angeles MA, Wong Chew RM, Arias Toledo E, Witham C, Santos Preciado JI. A new, rapid, and promising approach to aerosol immunization: Inflatable bags and valved masks. *Vaccine* 2009;27:4571-4575
 - 33) Gans H, Arvin A, Galinus J, Logan L, DeHovitz R, Maldonado Y. Deficiency of the humoral immune response to measles vaccine in infants immunized at age 6 months. *JAMA* 1998;280:527-32.
 - 34) Bautista Lopez N, Ward BJ, Mills E, McCormick D, Martel N, Ratnam S. Development ad durability of measles antigen-specific lymphoproliferative response after MMR vaccination. *Vaccine* 2000;18:1393-1401
 - 35) Gans H, Yasukawa L, Rinki M, DeHovitz R, Forghani B, Beeler J, Audet S, Maldonado Y, Arvin A. Immune responses to measles and mumps vaccination of infants at 6, 9, and 12 months. *J Infect Dis* 2001;184:817-26
 - 36) Pabst HF, Spady DW, Carson MM, Stelfox HT, Beeler JA, Krezolek MP. Kinetics of immunologic responses after primary MMR vaccination. *Vaccine* 1997;15:10-4.
 - 37) Plotkin S, Orenstein W, Offit P. *Vaccines*. 5^a edición, 2008. Editorial Saunders Elsevier. Capítulo 18: Vacuna de sarampión, páginas 353-398.
 - 38) Woodland D. Cell-mediated immunity to respiratory virus infections. *Current Opinion Immunology* 2003;15:130-135.
 - 39) Kim S, Favell R. CD8 $\alpha\alpha$ and T cell memory. *Science* 2004;304:529-530.
 - 40) Kaech S, Wherry J, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* 2002;2:251-262.
 - 41) Moulton VR, Farber DL. Committed to memory: lineage choices for activated T cells. *Trends in immunology* 2006;27(6):261-267
 - 42) Matter MS, Claus C, Ochesenbein AF. CD4+ T cell help improves CD8+ T cell memory by retained CD27 expression. *Eur J Immunol* 2008;38(7):1847-56
 - 43) Sanz I, Wei C, Lee FE, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin Immunol* 2008;20(1):67-82
 - 44) Liashenko VA, Krasnova VP, Youminova NV. Measles IgA in the nasal washings of adult volunteers and children immunized intranasally with measles vaccine L-16. *Hum Antibodies* 1999;9(3):143-8.
 - 45) Black FL. Measles active and passive immunity in a worldwide perspective. *Prog Med Virol*. 1989;361:33

- 46) Sato H, Albrecht P, Reynolds DW, Stagnio S, Ennis FA. Transfer of measles, mumps and rubella antibodies from mother to infant. Its effect on measles, mumps and rubella immunization. *Am J Dis Child.* 1979;133:1240-1243.
- 47) Albrecht P, Ennis FA, Saltzman EJ, Krugman S. Persistence of maternal antibody in infants beyond 12 months: mechanism of measles vaccine failure. *J Pediatr.* 1977;91:715-718.
- 48) Halsey NA, Boulos R, Mode F, et al. Response to measles vaccine in Haitian infants 6 to 12 months old. Influence of maternal antibodies, nutrition, and concurrent illness. *N Engl J Med.* 1985;313:544-549.
- 49) Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. *Fields Virology.* 3rd edition. Chapter 43: Measles virus. Griffin DE, Bellini WJ. Lippincott-Raven publishers. Philadelphia. 1996:1267-1297.
- 50) Roitt I. *Roitt's Essential Immunology.* Chapter 3. The Recognition of antigen. Antibodies. 1997:43-62.
- 51) Gans HA, Yasukawa L, Alderson A, Rinki M, DeHovitz R, Beeler J, Audet S, Maldonado Y, Arvin A. Humoral and Cell mediated immune responses to an early 2 dose measles vaccination regimen in the United States. *JID* 2004;190:183-90.
- 52) McChesney MB and Oldstone MBA. Virus-induced immunosuppression: infections with measles virus and human immunodeficiency virus. *Adv Immun* 1989;45:335-347.
- 53) Wainberg MA and Mills EL. Mechanisms of virus induced immune suppression. *Can Med Assoc J* 1985;132:1261-1267.
- 54) Lamb GA. Effect of HPV-80 rubella vaccine on the tuberculin reaction. *Am J Dis Child* 1969;118:261.
- 55) Berkovich S, Steiner P and Steiner M. Live rubella virus vaccine in tuberculous children. *Am J Dis Child.* 1969;118:252-257.
- 56) Zweiman B, Pappagianis D, Maibach H, and Hildreth EA. Effect of measles immunization on tuberculin hypersensitivity and in vitro lymphocyte reactivity. *Int Arch Allergy* 1971;40:834-841.
- 57) Hirsch RL, Mokhtarian F, Griffin DE, Brookd BR, Hess J and Johnson RT. Measles virus vaccination of measles seropositive individuals suppresses lymphocyte proliferation and chemotactic factor production. *Clin Immun Immunopathol* 1981;21:341-350.
- 58) CDC. Global Measles and rubella laboratory network, January 2004-june 2005. *MMWR* 2005;54(43):1100-1104
- 59) MaldonadoYA, Lawrence EC, DeHovitz R, Hartzell H, Albrecht P. Early loss of passive measles antibody in infants of mothers with vaccine-induced immunity. *Pediatrics* 1995;96(3):447-450
- 60) Albrecht P, Herrmann K, Burns GR. Role of virus strain in conventional and enhanced measles plaque neutralization test. *J Virol Methods.* 1981;1(3):251-60
- 61) Chen RT, Markowitz LE, Albrecht P, et al. Measles antibody: reevaluation of protective titers. *J Infect Dis* 1990;162:1036-1042
- 62) Schwendemann J, Choi C, Chrimade V et al. Dynamic differentiation of activated human peripheral blood CD8+ and CD4+ effector memory T

- cells. *J Immunol* 2005;175:1433
- 63) Morimoto C, Schlossman SF. P. Rambotti Lecture. Human naïve and memory T cells revisited: new markers (CD31 and CD27) that help define CD4+T cells subsets. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11(13):241-7
 - 64) Dolfi DV, Katsikis PD. CD28 and CD27 costimulation of CD8+ T cells: a story of survival. *Adv Exp Med Biol* 2007;590:149-70
 - 65) Robinson HL, Amara RR. T cell vaccines for microbial infections. *Nature Medicine* 2005;11(4):S25-S32
 - 66) Ruckdeschel JC, Graziano KD, Mardiney Jr. MR. Additional evidence that the cell-associated immune system is the primary host defense against measles (rubeola). *Cell Immunol* 1975;17:11-18.
 - 67) Samb B, Aaby P, Whittle HC, Seck AMC, Rahman S, Bennett J, Markowitz L, Simondon F. Serologic status and measles attack rates among vaccinated and unvaccinated children in rural Senegal. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:203-9.

ANEXO 1

Título del proyecto: Evaluación de la inmunogenicidad de la aplicación de la vacuna de sarampión por vía aerosol en niños sanos de 9 meses de edad

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimados Padres de Familia:

Debido a que sigue habiendo casos de sarampión en el mundo, es importante desarrollar otros métodos de aplicación de vacuna de sarampión que sean más baratos y efectivos. El Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNM y el servicio de Pediatría del Hospital General de México están realizando un trabajo para evaluar el desarrollo de defensas en los niños de 9 meses de edad a la vacuna contra sarampión. La vacuna que se aplicará es la misma que se aplica todos los días en México y se administrará por inyección subcutánea en el brazo izquierdo del niño o bien, por el método de aerosol (spray o rocío) sobre las mucosas de la nariz y garganta de su hijo. Ambas formas de administración de la vacuna son seguras y han sido usadas con gran éxito en varios estados de la República Mexicana y en otros países. Este proyecto de investigación corresponde a investigación con riesgo mínimo.

El objetivo principal de este trabajo es verificar que al aplicar la misma cantidad de dosis de vacuna de sarampión por vía aerosol se produzca una respuesta inmune en los niños similar a la vía subcutánea. La vía de administración en aerosol podría ayudar a vacunar a niños menores de 1 año de edad y a vacunar una gran cantidad de niños en un tiempo muy corto y se ha sugerido que es útil para ayudar a erradicar el sarampión de México y otros países.

La aplicación de la vacuna por aerosol tiene muchas ventajas porque se aplica más fácilmente al evitar la inyección y además se puede vacunar a muchos niños a la vez.

Si usted decide que su hijo(a) participe en este trabajo, personal de la UNAM y del Hospital General se encargará de:

- a) Realizar una evaluación general de su estado de salud
- b) Efectuara una valoración de su estado nutricional.
- c) Se le aplicara gratuitamente la vacuna triple viral (contra sarampión, rubéola y paperas)
- d) Conocerá su grupo sanguíneo y Rh.

Este trabajo consiste en la aplicación de la vacuna contra el sarampión, ya sea por medio de una inyección o por vía aerosol, así como la obtención de tres muestras sanguíneas de su bracito de aproximadamente una cucharada:

- a) Momentos antes de aplicarle la vacuna
- b) A los tres meses después de haberle aplicado la vacuna
- c) A los tres meses después de haberle aplicado la SRP (sarampión, rubéola y paperas)

La primera muestra es indispensable para conocer el numero de anticuerpos (defensas) de su hijo(a) antes de aplicarle la vacuna y poder comparar los resultados con la muestra posterior. La segunda es para saber si el organismo de su hijo responde adecuadamente y quedó realmente protegido contra el sarampión. La tercera es para ver si esta más protegido después de haber aplicado un refuerzo con una vacunación previa.

El material que se utiliza es nuevo y desechable, exclusivo para cada niño(a).En algunos casos es posible que el niño presente un poco de dolor y raramente un moretón en el sitio de la punción.

Si su hijo(a) participa, personal de salud altamente capacitado le hará algunas preguntas para conocer los antecedentes de salud de su hijo(a) y obtendrá las muestras sanguíneas, se le dará respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del niño.

La vacuna contra el sarampión es segura y en cualquiera de sus formas de aplicación solo produce algunas molestias leves, propias de la vacuna, como: dolor de cabeza (5%), tos (7%), rinitis (3%), diarrea (1%), calentura leve (5-15%) y en algunos casos puede presentarse una ligera erupción en la piel (5%) que se quita sola y no es contagiosa o enrojecimiento de los ojos en caso de la administración en aerosol (7%) que cede espontáneamente.

Su participación en este trabajo ayudara a que nuestros niños tengan mejores vacunas y una mejor salud. Toda la información que usted proporcione sobre la salud de su hijo(a) será confidencial, se le proporcionará información actualizada obtenida durante el estudio y si Ud. lo desea podrá retirar a su hijo de este estudio en el momento que lo decida, sin que ello repercuta en la atención que siempre se le ha brindado por parte de los servicios de salud, SIN EMBARGO NO PODEMOS PROMETER QUE UD. RECIBIRA ALGUN BENEFICIO ADICIONAL CON SU PARTICIPACION EN ESTE TRABAJO.

En caso necesario se dará el tratamiento médico y la indemnización a que legalmente tendrá derecho, por parte de la institución de atención a la salud, en el caso de daños que la ameriten, directamente causadas por la investigación y si existen gastos adicionales, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación.

En caso de que Ud. tenga alguna duda, puede consultar al Dr. Bogart Espinosa Torres Torija o a la Dra. Brenda Hernández Pérez al teléfono 2789-2000 Ext. 1417 las 24:00 hrs, o a la Dra. Hilda Hidalgo Loperena al teléfono 2789-2000 Ext. 1368 las 24hrs, o la Dra. Rosa María Wong Chew al 5623-2675 las 24 horas.

Los bebés como seres humanos tienen derechos. Al participar en este trabajo, Ud. Como tutor debe hacer uso entre otros, de los siguientes derechos:

- 1.- Estar informado de la naturaleza y propósito de este trabajo.
- 2.- Recibir una explicación detallada de los procedimientos que se realizaran con su bebé y sobre cualquier medicamento utilizado.
- 3.- Recibir una descripción de cualquier molestia o riesgo razonable que pudiera presentarse.
- 4.- Recibir una explicación de cualquier beneficio razonable que lo pudiera favorecer.
- 5.- Recibir información acerca de cualquier medida alternativa, así como medicamentos u otro tipo de tratamientos que pudieran ser útiles para el menor, así como de los beneficios y riesgos relativos que conllevan.
- 6.- Ser informado de las opciones de tratamiento en caso de que estén disponibles, si llegar a presentar complicaciones.
- 7.- Que tenga la oportunidad de hacer cualquier pregunta referente al trabajo o a los procedimientos involucrados.
- 8.- Ser instruido de que la aceptación en este trabajo puede ser retirada en cualquier momento y sin detrimento o perjuicio para el menor.
- 9.- Que le sea entregada una copia de este consentimiento, firmada y fechada.
- 10.- Que tenga Ud. La oportunidad para decidir acerca de su aceptación o negativa a participar en este trabajo, sin la intervención de cualquier fuerza, fraude, mentira, presión, coerción o influencia indebida sobre su decisión.

Su firma indica que ha leído y comprendido el contenido de esta carta, que ha hecho las preguntas que Ud. Considero oportunas y le han sido respondidas adecuadamente, que esta de acuerdo en que su hijo(a) participe, con base en la información recibida y que se le ha entregado una copia de este consentimiento.

NOMBRE DEL NIÑO

FECHA

NOMBRE DEL PADRE, MADRE O TUTOR

FIRMA DEL PADRE, MADRE O TUTOR

FIRMA TESTIGO

FIRMA TESTIGO

DOMICILIO

DOMICILIO