

**DETERMINACION DE LA POTENCIA DEL COMPONENTE “SARAMPION” DE  
LA VACUNA DE VIRUS VIVO DE SARAMPION Y RUBÉOLA U.S.P UTILIZADA  
EN LA JORNADA DE VACUNACIÓN 2005**

**ANDREA DEL PILAR BERMÚDEZ FORERO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL  
BOGOTA D.C., Noviembre, 2006**

**DETERMINACION DE LA POTENCIA DEL COMPONENTE “SARAMPION” DE  
LA VACUNA DE VIRUS VIVO DE SARAMPION Y RUBÉOLA U.S.P UTILIZADA  
EN LA JORNADA DE VACUNACIÓN 2005**

**ANDREA DEL PILAR BERMÚDEZ FORERO**

**TRABAJO DE GRADO**  
Presentado como requisito parcial para optar al título de  
**MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL  
BOGOTA D.C., Noviembre, 2006**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**DETERMINACION DE LA POTENCIA DEL COMPONENTE "SARAMPION" DE  
LA VACUNA DE VIRUS VIVO DE SARAMPION Y RUBÉOLA U.S.P UTILIZADA  
EN LA JORNADA DE VACUNACIÓN 2005**

**ANDREA DEL PILAR BERMÚDEZ FORERO**

**APROBADO**

---

**DRA. MARCELA MERCADO REYES**  
Departamento de Microbiología  
Pontificia Universidad Javeriana  
**DIRECTORA**

---

**DRA. GLORIA REY BENITO**  
Grupo de Virología  
Instituto Nacional de Salud  
**ASESORA**

---

**DRA. MARTHA VELANDIA MD**  
Ministerio de Protección Social  
**JURADO**

---

**DRA. OLGA VILLAMIZAR**  
Departamento de Microbiología  
Pontificia Universidad Javeriana  
**JURADO**

---

**DRA. MA. FERNANDA GUTIÉRREZ**  
Departamento de Microbiología  
Pontificia Universidad Javeriana  
**JURADO**

**DETERMINACION DE LA POTENCIA DEL COMPONENTE “SARAMPION” DE  
LA VACUNA DE VIRUS VIVO DE SARAMPION Y RUBÉOLA U.S.P UTILIZADA  
EN LA JORNADA DE VACUNACIÓN 2005**

**ANDREA DEL PILAR BERMÚDEZ FORERO**

**APROBADO**

---

**DRA. ANGELA UMAÑA MUÑOZ  
DECANA ACADEMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

---

**DR. DAVID GOMEZ MENDEZ  
DIRECTOR DE CARRERA  
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

## DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía en todo momento,  
A mis papas y mi hermano, por ser mi apoyo  
incondicional y por su enorme paciencia,  
A toda mi familia por su constante preocupación  
y respaldo, y a mis amigos por estar siempre a conmigo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Doctora Marcela Mercado Reyes, docente de la Pontificia Universidad Javeriana, por su dedicación y compromiso en el desarrollo de este trabajo.

Doctora Gloria Rey Benito, coordinadora del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud, por su apoyo constante y valiosos aportes para la realización de este trabajo.

Doctora Pilar Tavera y Doctora Mayerly Pardo, laboratorio de Enfermedades Eruptivas el Instituto Nacional de Salud, por la comprensión y aportes que me dieron durante el desarrollo del trabajo.

Doctor Carlos Mario Agudelo, por su importante contribución y constante interés desde el inicio de éste estudio.

A todo el personal del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud, por su colaboración para el desarrollo de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

### RESUMEN

### INTRODUCCION

1. MARCO TEÓRICO	¡Error! Marcador no definido.
1.1. Antecedentes Históricos	¡Error! Marcador no definido.
1.2. Virus del Sarampión	¡Error! Marcador no definido.
1.2.1. Propagación y Cultivo celular	¡Error! Marcador no definido.
1.2.1.1. Línea Celular Vero	¡Error! Marcador no definido.
1.2.2. Efecto Citopático	¡Error! Marcador no definido.
1.3. Enfermedad	¡Error! Marcador no definido.
1.3.1. Complicaciones	¡Error! Marcador no definido.
1.3.2. Diagnóstico	¡Error! Marcador no definido.
1.3.3. Respuesta Inmune	¡Error! Marcador no definido.
1.3.4. Tratamiento	¡Error! Marcador no definido.
1.3.5. Prevención y Control	¡Error! Marcador no definido.
1.3.6. Epidemiología	¡Error! Marcador no definido.
1.3.6.1. Epidemiología en Colombia	¡Error! Marcador no definido.
1.4. Vacuna contra Sarampión	¡Error! Marcador no definido.
1.4.1. Vacuna Inactivada	¡Error! Marcador no definido.
1.4.2. Vacuna de Virus Vivo Atenuado	¡Error! Marcador no definido.
1.4.3. Vacunas Combinadas	¡Error! Marcador no definido.
1.4.3.1. Vacuna combinada Sarampión Rubéola (Bivalente viral)	¡Error! Marcador no definido.
1.4.3.2. Vacuna combinada Sarampión, Rubéola y Parotiditis (Trivalente viral)	¡Error! Marcador no definido.
1.4.4. Reacciones adversas a la vacuna	¡Error! Marcador no definido.
1.4.5. Factores asociados con la eficacia de la vacuna del sarampión	¡Error! Marcador no definido.
1.5. Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI)	¡Error! Marcador no definido.
1.5.1. Objetivos del PAI	¡Error! Marcador no definido.
1.6. Control de Calidad	¡Error! Marcador no definido.
1.6.1. Prueba de Inocuidad	¡Error! Marcador no definido.
1.6.2. Prueba de Potencia	¡Error! Marcador no definido.
1.6.2.1. Medida de la Potencia de la Vacuna de Sarampión	¡Error! Marcador no definido.
2. JUSTIFICACION	¡Error! Marcador no definido.
3. OBJETIVOS	¡Error! Marcador no definido.
3.1. Objetivo General	¡Error! Marcador no definido.
3.2. Objetivos Específicos	¡Error! Marcador no definido.
4. MATERIALES Y MÉTODOS	¡Error! Marcador no definido.
4.1. Tipo de Estudio	¡Error! Marcador no definido.
4.2. Muestra	¡Error! Marcador no definido.
4.3 Variables	¡Error! Marcador no definido.



4.4. Procedimiento	¡Error! Marcador no definido.
4.5. Análisis de Datos	¡Error! Marcador no definido.
4.5.1.1. Método de Reed-Muench	¡Error! Marcador no definido.
5. RESULTADOS	¡Error! Marcador no definido.
5.1. Vacunas analizadas (Número y lote)	¡Error! Marcador no definido.
5.2. Resultados de la Prueba de Potencia	¡Error! Marcador no definido.
5.2.1. Formación de Sincitios	¡Error! Marcador no definido.
5.2.2. Cálculos	¡Error! Marcador no definido.
5.4. Análisis de Concordancia Interlote	¡Error! Marcador no definido.
6. DISCUSION	¡Error! Marcador no definido.
7. CONCLUSIONES	¡Error! Marcador no definido.
8. RECOMENDACIONES	¡Error! Marcador no definido.
BIBLIOGRAFIA	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS	

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del virus del Sarampión.	5
<b>Figura 2.</b> Genoma del virus del Sarampión.	6
<b>Figura 3.</b> Origen de las cepas vacunales de Sarampión.	17
<b>Figura 4.</b> Distribución de la placa de microtitulación para la prueba de potencia.	35
<b>Figura 5.</b> Monocapa confluyente de células Vero sin efecto citopático (25X).	40
<b>Figura 6.</b> Monocapa confluyente de células Vero con efecto citopático.	40
<b>Figura 7.</b> Monocapa confluyente de células Vero con efecto citopático.	41

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características generales de las vacunas contra sarampión.	20
<b>Tabla 2.</b> Rango de diluciones empleadas en la prueba de potencia.	34
<b>Tabla 3.</b> Tabla de registro de resultados de la microtitulación en placa.	36
<b>Tabla 4.</b> Tabla de resultados de la microtitulación en placa.	37
<b>Tabla 5.</b> Número de vacunas analizadas de acuerdo al fabricante, lote y procedencia.	39
<b>Tabla 6.</b> Distribución de los valores de $DICT_{50}$ para las vacuna analizadas del lote EU754 (Cartagena / Arauca).	41
<b>Tabla 7.</b> Distribución de los valores de $DICT_{50}$ para las vacuna analizadas del lote EU902 X (Yopal).	42
<b>Tabla 8.</b> Distribución de los valores de $DICT_{50}$ para las vacuna analizadas del lote EU903 X (Yopal).	42
<b>Tabla 9.</b> Distribución de los valores de $DICT_{50}$ para las vacuna analizadas del lote EU769 (Madrid).	42
<b>Tabla 10.</b> Distribución de los valores de $DICT_{50}$ para las vacuna analizadas Berna.	43
<b>Tabla 11.</b> Resultados de la prueba de hipótesis.	43
<b>Tabla 12.</b> Resultados del análisis de concordancia interlote.	43

## RESUMEN

El sarampión es una enfermedad viral aguda, responsable de más del 10% del total de las muertes anuales que se producen en el mundo en menores de 5 años de edad, de los cuales la mitad corresponden a menores de 1 año; estas defunciones se producen principalmente por diversas complicaciones asociadas con neumonía o panencefalitis subaguda (PEES).

En Colombia la estrategia de vacunación contra el sarampión han sido consideradas como exitosas, no obstante después de realizar dichas campañas no se evalúan indicadores como título de seroconversión o proporciones de seropositividad que afirmen dicho éxito. Según los reportes del Centro de Control de Enfermedades (CDC) del 2% a 5% de los de los vacunados no responden a la primera dosis. Por otra parte, en trabajos anteriores realizados en la población infantil en tres centros de vacunación en Bogotá, tanto en periodo preepidémico como en periodo posepidémico se pudo observar la baja seropositividad contra el sarampión (85% y 50% respectivamente) en niños vacunados. Estas cifras sugieren la búsqueda de otro posible factor condicional que este asociado a esta baja respuesta.

Por esta razón en este estudio se determinó la potencia de la vacuna bivalente fabricada por el laboratorio Serum Institute of India LTD (Vacuna de virus vivo de Sarampión y Rubéola USP), y que fue aplicada durante la Jornada Nacional de vacunación 2005, mediante la técnica de microtitulación en placa.

Se empleó para la verificación de la potencia 6 frascos por lote de la vacuna obtenido de las diferentes regiones del país, según lo descrito en la Serie de Informes Técnicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1994). Las diluciones de la vacuna a probar, fueron inoculadas en las placas de microtitulación, junto con la suspensión de células Vero. Tras el periodo de incubación, es posible observar en las células cambios citopáticos, lo que permitió determinar el título en

DICT<sub>50</sub> (Dosis infecciosa en cultivo de células 50%) calculado por el método de Reed-Muench.

Para el análisis de los resultados, primero se determinó la potencia de la vacuna dada como DICT<sub>50</sub>, y posteriormente se realizó una prueba de hipótesis para la media con el fin de determinar si el promedio de DICT<sub>50</sub> obtenido en la titulación era mayor al reportado por el fabricante. Adicionalmente se realizó un análisis de concordancia calculando el índice de correlación de concordancia ( $\delta_c$ ).

Los resultados de la potencia de las vacunas muestran que todos los lotes, excepto el lote EU903 X, cumplieron con el mínimo de 1000 DICT<sub>50</sub> establecidas por el fabricante ( $p = 0.94$ ) y el lote EU902 X, aunque fue estadísticamente significativo ( $p = 0.02$ ), presentó los valores promedio más bajos de potencia.

Teniendo en cuenta que la procedencia de estos lotes fue la ciudad de Yopal, es posible afirmar que las condiciones climáticas y geográficas de esta ciudad pudieron afectar el biológico bien sea por fallas en la cadena de frío, en el mantenimiento de estos o en el uso al momento de la vacunación. Las repercusiones en la población que es vacunada con lotes de baja potencia pueden ser cruciales en los resultados del éxito a largo plazo de una jornada de vacunación, ya que estos individuos no desarrollarían anticuerpos capaces de generar respuesta inmune adecuada que controle un brote.

## INTRODUCCION

El sarampión es una enfermedad infecciosa transmisible propia de la infancia, de distribución geográfica universal y de las enfermedades inmunoprevenibles es la que mayor mortalidad causa en el mundo. La OMS, estima que cada año ocurren unos cuatro millones de casos de sarampión en el mundo, declarándose solo una pequeña proporción, la mayor parte de las muertes se presentan en los países en desarrollo. Se ha calculado que las tasas de letalidad alcanzan entre 3 y 5% pero en algunos lugares llega a ser de 10 a 30%. La incidencia de las complicaciones y la letalidad varían en función del desarrollo socioeconómico del país, del estado nutricional de la población infantil y la disponibilidad de recursos sanitarios para el tratamiento de enfermos.

A nivel mundial se han realizado múltiples esfuerzos para la erradicación de esta enfermedad. En septiembre del 1995, los países de la Región de las Américas aprobaron de manera unánime un plan regional de acción para la eliminación de la transmisión autóctona del sarampión. Los países de la región han llevado acabo durante estos años estrategias de vacunación dirigidas a poblaciones de diferentes edades, con el fin de reducir al máximo el número de susceptibles y así evitar nuevos brotes.

En cuanto a Colombia, en el año 2002 se presentó la última epidemia donde se confirmaron 139 casos, de estos el 17% se presentaron en menores de 12 meses y el 18.5% en sujetos entre 15 y 34 años. En los últimos siete años el Instituto Nacional de Salud y la Universidad Javeriana han realizado estudios de seroconversión a la vacuna del sarampión, que evalúan de forma directa el impacto de la vacunación, obteniendo datos que no superaron el 60% de seroconversión en niños vacunados con vacuna monovalente y el 85% se seroconversión con vacuna triple viral. Por otra parte se han obtenido resultados de seropositividad no mayores al 75% en mujeres entre 17 y 28 años. Estas cifras sugieren la búsqueda de otro

posible factor condicional que este asociado a esta baja respuesta. El factor que queda por evaluar es el biológico empleado para estas inmunizaciones que se cree sea el causante de las bajas tasas de seroconversión, por tanto es necesario evaluar el desempeño del biológico midiendo potencia de la vacuna que se utiliza en el Programa Ampliado de Inmunización PAI Colombia.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1. Antecedentes Históricos**

La historia de la elaboración de la vacuna antisarampionosa viva atenuada comenzó en 1954 cuando Enders y Peebles consiguieron propagar el virus en cultivo celular humano y de monos a partir de secreciones de garganta, o de sangre obtenida de pacientes poco después de la aparición del exantema. A finales de la década del 50, Enders y colaboradores obtuvieron la cepa Edmonston B de la vacuna antisarampionosa atenuada, sometiendo el agente a 24 pases en cultivo primario de células renales, 28 pases en cultivo de células amnióticas y 6 pases seriados en embrión de pollo antes de adaptarlo a células fibroblásticas de embrión de pollo. Los estudios realizados a la vacuna en la década del 60 revelaron que era muy inmunogénica y protectora pero con reacciones clínicas adversas como fiebre alta y exantema lo que lo excluía de ser un agente inmunizador normal (OMS, 1993).

A mediados de los años 60, se elaboraron vacunas en los Estados Unidos, Japón, Yugoslavia, Rusia y China por atenuación adicional de la cepa Edmonston (AIK-C), Edmonston A (Schwarz), Edmonston B (Moraten, Edmonston Zagreb) o aislamientos separados (Leningrad 16, CAM-70, Shanghai-191). La atenuación adicional primero fue alcanzada por Schwarz con 85 pases adicionales de Edmonston A en células fibroblásticas de embrión de pollo. Aunque los niveles de anticuerpos logrados después de la atenuación adicional eran más bajos que después de la vacunación con Edmonston B o la infección natural, más adelante las vacunas atenuadas fueron asociadas a índices más bajos de reacciones clínicas y eran convenientes para el uso extenso sin la necesidad de la administración concurrente de gammaglobulina (OMS, 1993).

En la actualidad, las investigaciones sobre vacunas contra el sarampión proponen una vacuna ideal que reúna condiciones como que se pueda administrar a niños



pequeños, que no sea inyectable, que sea termoestable y que se pueda utilizar sin necesidad de reconstituirla. La aplicación de las técnicas de biología molecular en el desarrollo de vacunas ha permitido disponer de nuevos métodos para la fabricación de vacunas seguras y efectivas, como es el caso de los genes que codifican para las proteínas virales involucradas en la inducción de la inmunidad protectora contra la infección por sarampión, que son clonados e insertados dentro del genoma de un vector (Carballo et al., 1998).

Se ha reportado también la vacuna BCG combinada con un gen que codifica para la proteína N del virus del sarampión. Se plantea que si esta vacuna tiene éxito, podrá proteger a los niños al mismo tiempo contra el sarampión y la tuberculosis. Otros estudios están en curso para desarrollar una vacuna contra el sarampión basada en la inmunización con ácidos nucleicos. Además, como otro posible avance científico está el desarrollo de una vacuna en polvo que podría administrarse por vía nasal (mediante inhalación) y utilizarse de forma más práctica y menos costosa en campañas masivas de vacunación (Carballo et al., 1998).

## **1.2. Virus del Sarampión**

El virus del sarampión se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

Orden: *Mononegavirales*

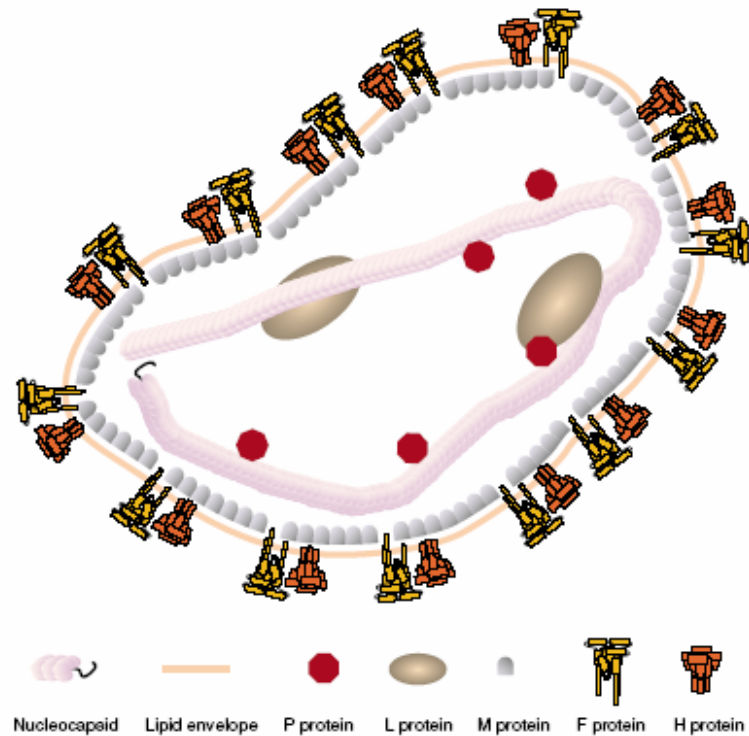
Familia: *Paramyxoviridae*

Subfamilia: *Paramyxovirinae*

Género: *Morbillivirus*

La familia *Paramyxoviridae* contiene importantes patógenos humanos y animales, incluyendo los virus del sarampión, de la peste bovina, de las paperas, parainfluenza y el virus respiratorio sincitial. Los paramixovirus se dividen en dos subfamilias; *Paramyxovirinae* que contiene los géneros *Morbillivirus*, *Respirovirus* y *Rubulavirus*, y la subfamilia *Pneumovirinae* que contiene los géneros *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*. (Bhella et al., 2002).

El virus del sarampión es un virus pleomórfico envuelto. El virión está compuesto por seis proteínas estructurales, tres de las cuales se asocian con la envoltura viral y tres forman complejos con el genoma viral (Figura 1) (OMS, 1993).



**Figura 1.** Representación esquemática del virus del sarampión.  
Fuente: Expert Reviews in molecular medicine, 2002.

Es de aproximadamente 150-300 nanómetros de diámetro y consiste en una bicapa lipídica externa que comprende la envoltura y la proteína de la matriz (M) que une a la superficie interna de la envoltura y rodea el genoma viral. El genoma está compuesto por una cadena sencilla de RNA no segmentado de polaridad negativa de cerca de 16.000 ribonucleótidos de longitud, rodeado por la nucleoproteína (N) y asociado a la fosfoproteína (P) y la polimerasa (L). Las proteínas L y P constituyen un complejo para formar la polimerasa viral. La cadena negativa de RNA sirve como plantilla para la síntesis de un RNA positivo, y este a su vez en un RNA negativo, que servirá de genoma para los nuevos virus. Las proteínas no virales C y V son codificadas por el gen de la fosfoproteína (P) pero derivan de diferentes traducciones del mismo RNA mensajero (Knipe et al., 2001).

Las regiones del genoma del RNA se muestran en la Figura 2. La nucleoproteína, N, forma la nucleocapside que contiene el RNA y que junto con la fosfoproteína y la proteína L, originan la replicación viral (Knipe et al., 2001).



**Figura 2.** Genoma del virus del sarampión.  
Fuente: Hilleman, 2002.

La proteína de la matriz (M) es necesaria para la replicación viral así como para el ensamble de los componentes virales durante la liberación de las partículas de la superficie celular (Knipe et al., 2001). La envoltura viral contiene la proteína M, constituida por dos glucoproteínas denominadas H y F. La glucoproteína H es la responsable de la absorción del virus a receptores en la célula huésped, y constituye también el antígeno que media la hemaglutinación. La glucoproteína F es la encargada de la fusión de las membranas del virus y la célula huésped durante la penetración del virus en la misma (Álvarez et al., 1997).

### 1.2.1. Propagación y Cultivo celular

La identificación del virus del sarampión como agente causante de la enfermedad fue realizada por primera vez en 1911, cuando secreciones filtradas del tracto respiratorio de pacientes con sarampión fueron inoculadas en monos macacos y causaron síntomas de la enfermedad en ellos. En 1954, el virus fue aislado y adaptado para crecer in vitro en varias líneas celulares de primates y células humanas (Carballo et al, 1998).

El virus puede propagarse en gran variedad de cultivos y líneas celulares. Puede ser aislado a partir de secreciones respiratorias y de la sangre durante la fase prodrómica hasta el primer y segundo días del exantema. El aislamiento más frecuente en cultivos celulares, se realiza en células linfoides y linfoblastoides humanas, pulmón embrionario humano, conjuntiva, riñón, intestino, piel, músculo (Hep-2), prepucio y células de útero, fibroblastos de embrión de pollo, células de

amnios humanos (Hela), cultivos de fibroblastos diploides de pulmón humano (WI-38 ó MRC5), células de riñón (Vero) y testículos de mono (Carballo et al., 1998).

#### 1.2.1.1. Línea Celular Vero

La línea celular Vero fue iniciada a partir de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), normal, adulto, en 1962. Su morfología es epitelial y su crecimiento es adherente. Se han mantenido normalmente en medio M-199, en Eagle's MEM o Earles' MEM. Esta línea ha sido ampliamente usada para estudios de replicación viral y ensayos de plaqueo. Ha sido utilizada exitosamente para pruebas con virus como SV-40, SV-5, sarampión, arbovirus, reovirus, rubéola, adenovirus, enterovirus y herpes simples (ATTC, 1992).

#### 1.2.2. Efecto Citopático

La replicación del virus del sarampión en monocapa de cultivo de células Vero y otras células permisivas, resulta en cambios citopáticos de tres tipos. Células gigantes multinucleadas (sincitios), alteración de la forma de las células y aparición de cuerpos de inclusión. El primer efecto es la formación de células gigantes multinucleadas resultantes de la fusión célula-célula y dan como resultado la formación de sincitios con 50 o más núcleos limitados por una sola membrana citoplásmica. Los núcleos en el centro de los sincitios tienen cromatina marginada y están experimentando muerte apoptótica de la célula (Knipe et al., 2001).

Las células infectadas también pueden cambiar de una forma poligonal normal a un aspecto de estrella o una forma dendrítica o alargada que incrementa con la refracción de la luz. Esto se puede relacionar con la producción de partículas que interfieren porque las células alargadas ocurren particularmente cuando hay una elevada infección y el medio se ha utilizado por completo (Knipe et al., 2001).

Ambos, el crecimiento alargado de las células y la formación de sincitios pueden contener cuerpos de inclusión intranuclear e intracitoplasmáticos. Las inclusiones citoplasmáticas son mas largas que las inclusiones nucleares y contienen RNA

encapsidado con la proteína N. Éstos consisten en una redistribución de la cromatina, que asume una posición marginal formando un anillo denso que se colorea intensamente con un tinte básico (Knipe et al., 2001; Matumoto, 1966).

### **1.3. Enfermedad**

El sarampión es una enfermedad altamente contagiosa, transmitida de persona a persona por las gotitas expelidas en las secreciones respiratorias de personas infectadas con el virus. El comienzo de la fase prodrómica se da con fiebre alta, tos, coriza, conjuntivitis y fotofobia. Esta es la fase más infecciosa de la enfermedad (Murray et al, 2005).

La infección por el virus del sarampión se adquiere por el tracto respiratorio, o en algunas ocasiones a través de la conjuntiva. Los viriones invaden el sistema linfático regional, se multiplican en el epitelio respiratorio, y se diseminan a lugares distantes como amígdalas, bazo, ganglios linfáticos, apéndice y en general, al sistema reticuloendotelial. La infección reticuloendotelial es seguida por una segunda viremia en la cual los virus infectan piel, tracto respiratorio y sangre, y la enfermedad se manifiesta después de una incubación de 10-12 días. La erupción del sarampión se produce como consecuencia de la interacción entre las células de T y las células infectadas con el virus (Duke et al., 2003; Álvarez et al., 1997).

Uno o dos días antes de aparecer el exantema, se presentan lesiones típicas en las membranas mucosas, conocidas como manchas de Koplik. Son pápulas diminutas (1 a 2mm), blanco-grisáceas, ubicadas sobre una mucosa muy enrojecida; desaparecen a los dos o tres días de presentarse el exantema (Murray et al., 2005).

Las características especiales del exantema lo diferencian de los producidos en otras infecciones virales. Por lo general se inicia en el cuero cabelludo y se extiende en sentido descendente a nuca, cara, hombros, dorso y región anterior del tronco. Por su morfología, el exantema sarampionoso es maculopapular, al inicio es difuso, pero pronto se hace confluyente y forma una sola mancha eritematosa superficial. Cuando el exantema alcanza los miembros inferiores, aparece la descamación de la

piel de la cara y demás regiones, y progresa de la misma manera como se diseminó el exantema. Esta etapa corresponde al periodo descamativo, con manchas parduzcas con áreas intercaladas de color normal en la piel (Álvarez et al., 1997).

### 1.3.1. Complicaciones

El sarampión es una enfermedad peligrosa por las diversas y frecuentes complicaciones que conlleva, las cuales se pueden dar por causa de la replicación del virus o por sobreinfección bacteriana. La replicación del virus es más prolongada y extensa en pacientes con defectos previos de inmunidad celular, como desnutridos, personas que sufren enfermedades malignas tratadas con inmunosupresores y agentes citotóxicos, y en niños con anomalías congénitas de la inmunidad mediada por células. Las infecciones bacterianas se favorecen por disminución de las defensas del paciente, o por las anomalías hísticas originadas por la replicación vírica, que facilitan el acceso de las bacterias (Álvarez et al., 1997).

Las complicaciones del sarampión incluyen otitis media, laringitis, laringotraqueitis, diarrea, encefalitis, meningitis, panencefalitis esclerosante subaguda, septicemia y ceguera. La neumonía es una de las complicaciones más serias, causante de aproximadamente el 60% de las muertes causadas por el sarampión, en estos pacientes es muy común una sobreinfección bacteriana (Murray et al., 2005).

Una de las complicaciones más peligrosas del sarampión es la encefalitis, que puede ocurrir en al menos 0.5% de los infectados y puede ser fatal en el 15% de casos. La encefalitis puede ocurrir raramente durante la enfermedad aguda, pero comienza generalmente 7 a 10 días después del inicio de la misma. Esta encefalitis postinfección es causada por reacciones inmunopatológicas, y esta asociada con la demielinización de las neuronas, y ocurren más a menudo en niños y adultos (Murray et al., 2005).

El sarampión atípico ocurrió en personas que recibieron una vacuna de virus inactivado y posteriormente estuvieron expuestas al virus salvaje del sarampión. La

previa sensibilización con la protección escasa realza la respuesta inmunopatológica al contacto con el virus salvaje del sarampión. La enfermedad comienza precipitadamente y es una presentación más intensa del sarampión (CDC, 2006 ; Murray et al., 2005).

La panencefalitis esclerosante subaguda (PEESA) es una complicación neurológica extremadamente grave, que afecta aproximadamente siete de cada millón de pacientes. La incidencia de PEESA ha disminuido marcadamente como resultado de los programas de vacunación contra el sarampión. Esta enfermedad ocurre cuando un virus defectuoso del sarampión persiste en el cerebro y actúa como virus lento (Murray et al, 2005).

El virus se puede replicar y propagar directamente de célula a célula pero no se libera. La PEESA es más frecuente de niños que fueron infectados cuando eran menores de 2 años y ocurren inicialmente aproximadamente 7 años después del sarampión clínico. El paciente demuestra cambios en la personalidad, comportamiento, y memoria, seguidos por ceguera, espasmos mioclónicos, y eventualmente la muerte (Murray et al., 2005).

### 1.3.2. Diagnóstico

Las características clínicas clásicas del sarampión (fiebre, erupción eritomatosa maculopapular, coriza, tos, conjuntivitis y manchas de Koplik) son generalmente suficientes para hacer el diagnóstico. Sin embargo, no todos estos síntomas pueden presentarse en el sarampión, y muchos coinciden con otras enfermedades. Los procedimientos de diagnóstico de laboratorio consisten en el aislamiento del virus, detección directa del virus o de antígenos virales en secreciones, y detección de anticuerpos por métodos serológicos o inmunoensayos enzimáticos (Knipe et al., 2001).

El virus del sarampión puede ser aislado a partir de muestras de orina, aspirado nasofaríngeo, sangre, o frotis de garganta, obtenidas durante la fase febril de la enfermedad (CDC, 2006).

El diagnóstico suele basarse en datos clínicos y epidemiológicos; puede confirmarse por la presencia de anticuerpos IgM específicos contra el sarampión o un aumento significativo de las concentraciones de anticuerpos obtenidos en la fase aguda y en la convalecencia (Carballo et al., 1998). Generalmente, una persona susceptible previamente expuesta a la vacuna o al virus salvaje del sarampión, primero generará una respuesta de IgM y después una respuesta de IgG. La respuesta de IgM será transitoria (1-2 meses), y la de IgG permanecerá por años (CDC, 2006).

La interpretación correcta de los datos serológicos requiere conocimiento del tiempo en el cual las muestras fueron obtenidas respecto a la aparición de la erupción y las características del ensayo de anticuerpos. Este punto es importante cuando se interpretan los resultados de los sueros IgM negativos, ya que los anticuerpos no pueden ser detectados en el primer o segundo día después de la aparición de la erupción y no siempre se detectan entre los 30 y 60 días posteriores (Carballo et al., 1998).

### 1.3.3. Respuesta Inmune

Las respuestas inmunes después de la vacunación o de la infección natural son muy similares. Ante una infección por virus silvestre o virus atenuado de sarampión se desarrolla tanto una respuesta de anticuerpos como de inmunidad celular e interferón. Las dos principales diferencias son, que la aparición de anticuerpos es unos pocos días mas corta en la vacunación que en la infección natural, y los niveles de anticuerpos son elevados en la infección natural. Los anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación declinan marcadamente con el tiempo y con frecuencia se hacen indetectables después de varios años (Ruiz et al, 2005).

Sin embargo, en la mayoría de estudios longitudinales en niños vacunados a los 12 meses de edad o mayores y en los que se demostró seroconversión temprana, se continúa detectando niveles de anticuerpos, así sean muy bajos. Entonces, aunque la respuesta de anticuerpos y su persistencia parece ser cuantitativamente diferente entre la infección natural y la vacunación, desde el punto de vista cualitativo es similar y parece conferir inmunidad de por vida (Ruiz et al., 2005).



En la infección aguda primaria del sarampión, se producen los anticuerpos IgM, IgG, e IgA. La concentración de anticuerpos IgM en el suero alcanza su pico 7-10 días después del inicio de la erupción y puede persistir por 1 mes después de la infección natural o de la vacunación. El pico de concentración de anticuerpos IgG en el suero se alcanza a las 4 semanas y declina posteriormente, pero persiste de por vida (Duke et al., 2003).

Una reexposición al virus salvaje o vacunal del sarampión estimula las células de memoria para producir las respuestas específicas para sarampión en las cuales los anticuerpos de IgG aumentaran rápidamente cerca de 12 días después de la nueva exposición. Sin embargo, la protección a largo plazo no requiere nueva exposición porque la memoria inmunológica causa una producción continua del anticuerpo y de las células T específicas contra el virus del sarampión (Duke et al., 2003).

#### 1.3.4. Tratamiento

El sarampión no complicado evoluciona satisfactoriamente hacia la mejoría. Solo requiere el control sintomático de la fiebre y el aporte de líquidos para evitar la deshidratación (Álvarez et al., 1997).

No existe tratamiento antiviral para el sarampión. La ribavirina inhibe la replicación del virus del sarampión y puede reducir la severidad de los síntomas. La administración de altas dosis de vitamina A durante la fase aguda del sarampión disminuye la morbilidad y mortalidad incluso en ausencia de la evidencia clínica de deficiencia de vitamina A. Los numerosos agentes terapéuticos, incluyendo bromodeoxiuridina, azaguanina, amantadita, eter, isoprinosina, interferon alfa (IFN), se han utilizado para el tratamiento de PEESA. La evaluación de la eficacia de estos tratamientos es difícil porque la enfermedad es rara, de curso variable, los informes son anecdóticos y los beneficios son mejores a corto plazo (Knipe et al., 2001).

#### 1.3.5. Prevención y Control

La lucha contra el sarampión se puede dividir en tres estrategias: 1) Control, 2) Prevención y 3) Erradicación. Dichas estrategias, se pueden emprender en

diferentes tiempos y lugares, según las necesidades y recursos con que se cuente. El objetivo del control es reducir la ocurrencia del sarampión y cualquier muerte asociada. Como la cobertura de vacunación ha aumentado, la epidemiología de la enfermedad ha sufrido cambios substanciales y de manera compleja, proporcionando grandes ventajas para los niveles blanco de las comunidades aunque no han alcanzado para la eliminación del evento (Duke et al., 2003).

Con la cobertura mayor del 80%, el intervalo entre los brotes se ha alargado de 2 a 4 años hasta 4 a 8 años. Además, los brotes que se presentan en lugares donde se ha dado alta cobertura de vacunación, se asocian con una baja fatalidad. Además, los niños vacunados que desarrollan el sarampión tienen un índice mucho más bajo de complicaciones y un riesgo más bajo de mortalidad que los no inmunizados. La prevención de los brotes requiere que la transmisión del virus del sarampión sea interrumpida por un alto nivel sostenido en la cobertura de la inmunización (mayor del 95%) (Duke et al., 2003).

La Organización Panamericana de la Salud recomienda una estrategia de tres partes para la interrupción de la transmisión del sarampión: 1) Una campaña a nivel nacional dirigida a niños entre 1-14 años de edad; 2) Vacunación rutinaria entre niños; y 3) Campañas masivas cada 4 años orientada a todos los niños de 1-4 años independientemente del estado anterior de vacunación contra el sarampión (Duke et al., 2003).

El sarampión, dispone de tres criterios fundamentales: los seres humanos son el único huésped que mantiene la circulación del virus; las pruebas de diagnóstico sensibles y específicas están disponibles; y, debido a que el sarampión es monotípico, solamente se requiere de vacuna monovalente. Sin embargo, se presentan muchas limitaciones para la erradicación, incluso bajo programas bien manejados, entre el 2% y el 5% de individuos seguirán sin protección, lo que genera una acumulación de individuos susceptibles en un cierto plazo. La falta de vacunas, la importación del sarampión y alto índice replicación del virus hacen esta situación inevitable, aunque teóricamente el 100% de cobertura podría ser sostenida (Duke et al., 2003).

### 1.3.6. Epidemiología

Desde la introducción de vacunas eficaces contra el sarampión, la epidemiología del sarampión ha cambiado tanto en países en vías de desarrollo, como en países desarrollados. Debido al incremento en la cobertura de vacunación, se ha dado una marcada reducción en la incidencia del sarampión; y con la disminución de la circulación del virus, la edad promedio en la cual ocurre la infección ha aumentado (PAHO, 2005).

El sarampión ocurre por todo el mundo en patrones estacionales distintos. En climas templados, los brotes ocurren generalmente al final del invierno o inicio de la primavera. En climas tropicales, la transmisión aumenta después de la estación de lluvias. En países en vías de desarrollo con cobertura baja de la vacunación, las epidemias ocurren a menudo cada dos a tres años y duran generalmente entre dos y tres meses, aunque su duración varía según tamaño de la población, la densidad, y el estado inmune de la misma (PAHO, 2005).

La introducción de la vacuna del sarampión en las Américas en los años 60 dio lugar a una disminución marcada del número de casos reportados del sarampión. La creación del Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI) en 1977 y el aumento en la cobertura de vacunación, han contribuido a que el número de casos se reduzca y a que se de una tendencia hacia intervalos más largos entre años epidemiológicos (PAHO, 2005).

Incluso en áreas con altas tasas de vacunación, pueden ocurrir brotes. Los períodos de baja incidencia, pueden ser seguidos por brotes periódicos, con un aumento en el número de años entre las epidemias. Los brotes son generalmente debido a la acumulación de las personas susceptibles al virus del sarampión, que incluyen personas sin vacunar y vacunadas pero que fallaron la seroconversión. Después de la introducción de la vacuna del sarampión durante los años 60, los países que habían alcanzado alta cobertura de vacunación experimentaron una reducción del 98% en el número de casos reportados. Sin embargo, las epidemias periódicas del

sarampión continuaron ocurriendo, especialmente en áreas urbanas grandes. Estos brotes ocurrían sobre todo en niños en edad preescolar sin vacunar (PAHO, 2005).

En áreas donde el sarampión sigue siendo endémico, una gran proporción de casos ocurren en niños menores de 1 año, el grupo de edad con la tasa de fatalidad más alta del sarampión. En esas áreas, solamente un breve período existe entre la disminución del anticuerpo materno y la exposición de los niños al virus circulante del sarampión (PAHO, 2005).

#### 1.3.6.1. Epidemiología en Colombia

En Colombia, se han presentado en los últimos 20 años epidemias en los años 1981, 1987, 1990 y 1993. En estos brotes las tasas alcanzaron 118,5, 67,9, 42,1 y 28 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (MPS, 2005).

Desde la introducción de la vacuna al país en 1978, durante las primeras dos décadas no se observaron cambios radicales en la tendencia de la enfermedad producto de las bajas coberturas. Las coberturas de vacunación contra sarampión en niños menores de un año fueron inferiores al 80% hasta finales de los ochenta y es hasta 1990 que se alcanzan cifras cercanas al 80%. En el periodo de 1993 a 1996 se obtienen las mejores coberturas del programa regular por arriba del 90%, pero a partir de 1997 estas presentan un descenso preocupante (MPS, 2005).

A partir de la epidemia del año 1993 donde se registraron más de 5.000 casos y 48 muertes por complicaciones, se dio inicio al plan de eliminación del Sarampión aplicando vacuna antisarampionosa a niños de 9 meses a 14 años, alcanzando una cobertura del 97%. Luego, las estrategias se encaminaron al mantenimiento de coberturas no inferiores al 95%, con vacuna triple viral (sarampión, parotiditis y rubéola) en niños de un año de edad. Sin embargo, estas coberturas mostraron tendencia a la baja, tanto que en el 2000 fueron del 80% (Cáceres et al., 2003).

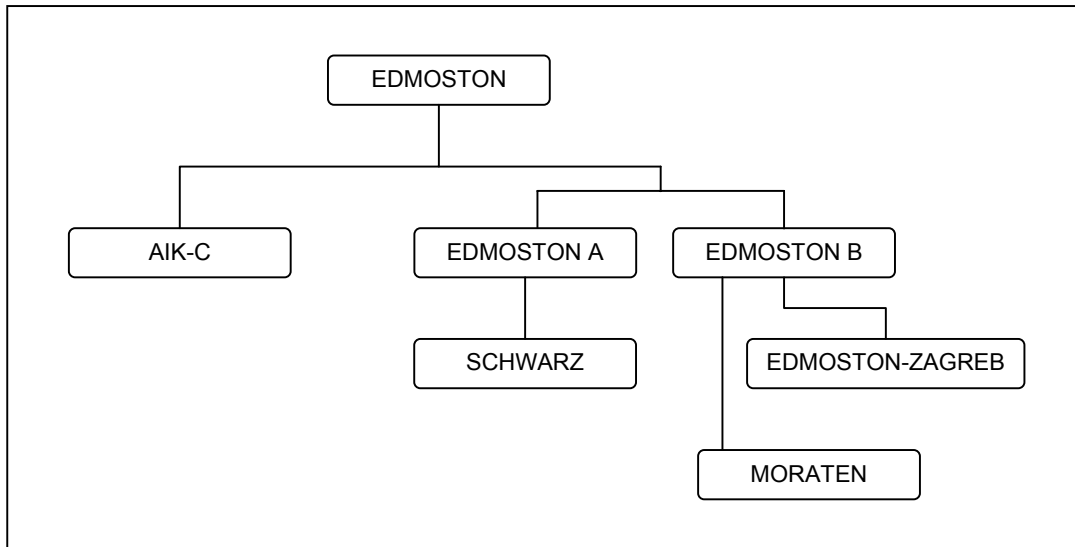
Para el año 2002, se presentó la última epidemia de sarampión en Colombia, donde se confirmaron 139 casos. El primer caso confirmado de sarampión, inició erupción

en enero teniendo como antecedente relevante, contacto con otro caso confirmado de sarampión en Maracaibo (Venezuela). Siete casos (10%) se presentaron en lactantes menores de 12 meses de edad, 30 (44%) en niños de 1-4 años de edad, 14 (20%) en personas de 5-14 años, 8 en personas de 15-24 años, 7 (10%) en personas de 25-34 años y 2 (3%) en personas con mayores de 35 años (OPS/OMS, 2002).

Las acciones se encaminaron a proteger con vacuna antisarampionosa a todos los niños entre 6 y 11 meses de edad y población de 14 a 39 años en todo el territorio nacional, revacunando a los doce meses de edad con vacuna triple viral; lograr cobertura de vacunación del 95% en todos los municipios y distritos del país, con especial atención en aquellos de alto riesgo; y verificar y evaluar el cumplimiento de las coberturas de vacunación mediante monitoreo rápido (Cáceres et al., 2003).

#### **1.4. Vacuna contra Sarampión**

Varias cepas de la vacuna de sarampión están siendo producidas y utilizadas en diversas partes del mundo. Las vacunas de uso frecuente por el Programa Ampliado de Inmunización (PAI) contienen las cepas Schwarz (SW) o Edmonston Zagreb (EZ) (Garly et al., 2003). Estas cepas se desarrollaron a mediados de los años 60, por atenuación adicional de la cepa Edmonston (AIK-C), Edmonston A (Schwarz), Edmonston B (Moraten, Edmonston Zagreb) o aislamientos separados (Leningrad 16, CAM-70, Shanghai-191) (Figura 3) (OMS, 1993).



**Figura 3.** Origen de las cepas vacunales de sarampión.  
Fuente: OMS,1993.

La vacuna del sarampión está disponible como preparación monovalente, vacuna combinada con rubéola, vacuna combinada con rubéola y parotiditis (MMR), o vacuna combinada con rubéola, parotiditis y varicela (MMRV). La vacuna del sarampión es preparada en cultivo de fibroblastos de embrión de pollo. Las vacunas generalmente tienen presentación de polvo liofilizado y se reconstituyen con agua estéril, libre de preservativo. Las vacunas contienen una pequeña cantidad de albúmina humana, neomicina, sorbitol y gelatina (CDC, 2006).

#### 1.4.1. Vacuna Inactivada

La vacuna inactivada con formaldehído a partir de la cepa Edmonton B fue la primera utilizada entre 1963 y 1967. Generalmente, se administraban tres dosis de la vacuna inactivada o dos dosis de vacuna inactivada y una dosis de vacuna viva mensualmente, pero los efectos secundarios de fiebre y brote similar a la enfermedad que se presentaban hasta en el 50% de los casos, sumado a la protección temporal y a la aparición del sarampión atípico, llevaron a su retiro (Hilleman, 2002; OMS, 1993).

#### 1.4.2. Vacuna de Virus Vivo Atenuado

La primera vacuna viva atenuada del sarampión fue desarrollada por la adaptación de la cepa Edmonston del virus después de pases secuenciales en cultivo de riñón de mono (24 pases), seguido de cultivo de células amnióticas humanas (28 pases), y por último en células de embrión de pollo (6 pases) para producir la cepa Edmonston B (Knipe et al., 2001).

La atenuación permitía superar dos de las dificultades de la vacuna muerta: la inmunogenicidad debía ser y por tanto pasar la protección de temporal a duradera y por ser replicativa, la vacuna posee además la proteína F de la envoltura, presente solo en esta fase y la presencia de anticuerpos contra ella impide el desarrollo del sarampión atípico y de la panencefalitis esclerosante subaguda (Álvarez et al., 1997).

Al adaptar el virus de la cepa Edmonston B a crecer a una temperatura de 32°C en lugar de 36°C, se originó la cepa Moraten tras 40 pases en células de embrión de pollo y la cepa Edmonston-Zagreb tras 19 pases en células diploides humanas WI-38. Con la misma técnica se obtuvo a partir de la cepa Edmonston A, la cepa Schwarz después de 85 pases en células de embrión de pollo (Álvarez et al., 1997).

#### 1.4.3. Vacunas Combinadas

Son vacunas combinadas las presentaciones consistentes en una única unidad de administración simple, conteniendo más de un componente antigénico. Las formulaciones de vacunas combinadas están hechas para que no se presenten incompatibilidades ni inestabilidades físicas ni biológicas entre sus componentes inmunizantes. Generalmente, la combinación de los distintos principios antigénicos se realiza en el momento de la fabricación de la vacuna, pero también, cuando se ha estudiado en ensayos clínicos adecuados, se podrían mezclar en el momento de la administración. Se administran de una sola vez y en el mismo sitio anatómico. En determinadas ocasiones constan de un vial conteniendo un liofilizado de algunos de

los antígenos que se disuelve o reconstituye de forma extemporánea con el disolvente que llevan los restantes antígenos (Arya et al., 2004).

La vacuna del sarampión ha demostrado ser eficaz cuando se aplica simultáneamente con DPT y/o la vacuna de poliomielitis, de la fiebre amarilla y con la vacuna de la hepatitis B. El Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI) por lo tanto recomienda la administración simultánea de la vacuna del sarampión con otros antígenos del PAI (Hilleman, 2002).

#### 1.4.3.1. Vacuna combinada Sarampión Rubéola (Bivalente viral)

Es una suspensión liofilizada de una combinación de cepas de virus vivos atenuados de sarampión (cultivada en embrión de pollo) y rubéola (cultivada en células diploides humanas). Existen a la fecha diferentes vacunas comerciales que varían en las cepas incluidas. Para sarampión, las cepas son Schwarz o Edmonston-Zagreb y para rubéola todas tienen la cepa Wistar RA27/3 (Escobar et al., 1992).

La vacuna se presenta como un polvo liofilizado para reconstituir exclusivamente en su diluyente apropiado. Puede contener trazas de antibióticos. Debe conservarse entre 2° C y 8° C. Permanece viable durante 2 años desde la fecha de expedición del laboratorio productor. Entre 22° y 25° permanece en estado satisfactorio durante 1 mes y entre 35° y 37°, durante una semana. El frasco multidosis, una vez iniciado su uso, se debe desechar después de una jornada de trabajo (6 horas), durante la cual debe estar refrigerada a la temperatura mencionada (Escobar et al., 1992).

La vacuna bivalente esta indicada para mujeres en postparto y postaborto inmediato y niños mayores de 12 meses (como alternativa cuando no haya disponibilidad de la vacuna triple viral). Esta vacuna se aplica en dos dosis de 0,5 ml cada una; la primera a los 12 meses de edad y la segunda dosis o refuerzo a los 5 años (antes del ingreso escolar). Cuando se interrumpe el esquema de vacunación debe completarse con la dosis faltante sin interesar el tiempo transcurrido desde la última dosis. La vacuna contra el sarampión se puede administrar simultáneamente con



otras vacunas, actualmente en uso. Deben ser aplicadas en sitios diferentes. En la vacunación sucesiva con vacunas con virus vivos atenuados parenterales, es recomendable dejar un intervalo mínimo de 30 días entre dosis (Escobar et al., 1992).

En cuanto a la inmunidad de la vacuna, está determinada por el constituyente específico, la eficiencia es alta y la efectividad está correlacionada entre las tasas de sarampión y las de coberturas vacúnales (Tabla 1) (Escobar et al., 1992).

**Tabla 1.** Características generales de las vacunas contra sarampión.

<b>VACUNA</b>	<b>INMUNOGENICIDAD</b>	<b>EFICACIA</b>	<b>DURACIÓN</b>
Antisarampionosa	90 – 95%	93 - 98%	10 – 15 años
Antirrubéolica	> 98%	87 - 91%	Aproximadamente 10 años

#### 1.4.3.2. Vacuna combinada Sarampión, Rubéola y Parotiditis (Trivalente viral)

La introducción y el uso generalizado de la vacuna combinada de virus vivos atenuados contra sarampión, rubéola y parotiditis, ha sido responsable de una significativa disminución de la morbilidad y mortalidad por estas enfermedades en países desarrollados. En la mayoría de los países desarrollados, esta vacuna ha reemplazado sistemáticamente a las vacunas monovalentes contra sarampión, rubéola y parotiditis (Ayala et al., 2004).

En la preparación de la vacuna trivalente viral, se ha ajustado la dosis infecciosa de cada componente viral para imposibilitar la posible interferencia de uno sobre otro y así asegurar la respuesta inmune adecuada contra los tres antígenos (Hilleman, 2002).

No se conoce con exactitud la duración de la inmunidad inducida por la vacuna, pero los datos serológicos y epidemiológicos recolectados durante más de treinta años de uso de la vacuna, indican la persistencia de los anticuerpos y la protección continua de la infección natural. El uso de la vacuna combinada contra el sarampión,

rubéola y parotiditis no incrementa la probabilidad de que ocurran las reacciones adversas reportadas cuando se administran sus distintos componentes en forma monovalente (Ayala et al., 2004).

#### 1.4.4. Reacciones adversas a la vacuna

Las reacciones adversas que siguen la vacuna del sarampión (excepto reacciones alérgicas) representan la replicación del virus vacunal del sarampión seguida de la enfermedad. Estos eventos ocurren 5 a 12 días posvacunación y solamente en las personas que son susceptibles a la infección. No hay evidencia del riesgo creciente de reacciones adversas después de la vacunación en las personas que son ya inmunes a la enfermedad (CDC, 2006).

La fiebre es la reacción adversa más común después de la vacunación, ya que entre el 5% al 15% de personas susceptibles desarrollan una temperatura de 39,4°C o superior, que generalmente ocurre 7 a 12 días después de la vacunación y dura de 1 a 2 días. Además, la vacuna contra el sarampión pueden causar una erupción transitoria, que aparece de 7 a 10 días después de la vacunación (CDC, 2006).

#### 1.4.5. Factores asociados con la eficacia de la vacuna del sarampión

##### a. Edad de vacunación:

La edad recomendada de la inmunización ha variado desde 6 a 15 meses y sigue siendo un tema de la discusión. La probabilidad de seroconversión y los niveles de anticuerpos inducidos son determinados por el nivel de anticuerpos maternos específicos contra sarampión persistentes y la edad del niño. Por lo tanto, la edad recomendada para la inmunización es determinada por un balance entre la edad óptima para la seroconversión y la probabilidad de adquirir el sarampión antes de esa edad. Ambos parámetros muestran variación regional. En las áreas donde el sarampión sigue siendo frecuente, la inmunización del sarampión se realiza rutinariamente a los 9 meses, mientras que en áreas con poco sarampión, la inmunización es a menudo entre los 12 y 15 meses de edad (Knipe et al., 2001).

b. Nivel de anticuerpos maternos:

Los menores de 1 año, quienes especialmente a partir de los 9 meses pueden ser susceptibles a sufrir la enfermedad, en muchos casos no logran ser inmunizados por interferencia de niveles de anticuerpos antisarampión transferidos transplacentariamente (ATT) que pueden ser muy bajos para prevenir infección con inóculos de virus silvestre (menores de los niveles protectores) y sin embargo ser capaces de inhibir la replicación del virus vacunal (Ruiz et al., 2005).

c. Estado Nutricional:

Varios estudios han mostrado tasas de seroconversión similares en niños bien alimentados como en niños en estado de malnutrición, aunque la respuesta a la inmunización del sarampión fue retardada en niños mal alimentados (OMS, 1993).

d. Cepa Vacunal:

Varios estudios han comparado el efecto de la vacuna Edmonston Zagreb (EZ) y la vacuna Schwarz, por inyección subcutánea en la misma dosis y edad, encontrando que vacuna EZ da tasas superiores de seroconversión que la vacuna Schwarz. Además, algunos datos sugieren que puede haber diferencia entre las vacunas de sarampión de la misma cepa producidas por diversos fabricantes. La vacuna EZ producida en México fue comparada con la producida por el Instituto de Inmunología, Zagreb. Los niveles del anticuerpos después de la vacunación con la vacuna mexicana eran más bajos que los de la vacuna de Zagreb (OMS, 1993).

e. Número de Dosis:

En Colombia la vacunación es al año de edad y el refuerzo a los 5 años. Los programas que incluyen dos dosis pueden potencialmente prevenir el sarampión en el grupo de edad que esta por debajo de la edad normal de la vacunación (Carballo et al, 1998).

f. Campañas de vacunación:

En América latina las campañas de vacunación van dirigidas a niños de 1 a 14 años de edad, sin importar los antecedentes de vacunación o de enfermedad, esto ha permitido interrumpir la transmisión del sarampión (Garly et al., 2003).

La deficiencia en el mantenimiento de la cadena de frío se ha implicado como causa de la baja eficacia de la vacuna. Aunque nuevos estabilizantes han hecho la vacuna liofilizada menos lábil al calor desde, la vacuna reconstituida sigue siendo sensible al calor y a la luz del sol (OMS, 1993).

g. Vía de administración:

Se han probado varias vías alternas para administrar la vacuna del sarampión, pero ninguna de las rutas oral, conjuntival, intranasal o intradérmica ha probado con éxito diferencia en términos de respuesta de anticuerpos en comparación con la administración subcutánea. La inmunización mucosal es interesante porque tiene la capacidad de estimular inmunidad local mediada por la IgA y estimular la inmunidad celular y relacionar posiblemente los anticuerpos maternos mejor que una vacuna subcutánea (Garly et al., 2003).

En términos de cepa vacunal, la vacuna Schwarz ha demostrado que se inactiva rápidamente en forma de aerosol, mientras que la vacuna EZ es más estable, y que genera mayor inmunidad, especialmente en niños con anticuerpos maternos o vacunales de sarampión (Garly et al., 2003).

### **1.5. Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI)**

Es el resultado de una acción conjunta de las naciones del mundo que requiere de alto nivel técnico y respaldo político para lograr coberturas universales de vacunación con el fin de disminuir las tasas de mortalidad y morbilidad causadas por enfermedades inmunoprevenibles en la población menor de 5 años.

En las Américas y en Colombia se ha dado un avance acelerado en cuanto al control de las enfermedades inmunoprevenibles desde 1978 cuando se instaló el PAI en el país y se empezó a proteger contra seis enfermedades; actualmente se protege a nuestra población contra 11 enfermedades.

#### **1.5.1. Objetivos del PAI**

- Consolidar la certificación de la erradicación de la Poliomieltis.

- Erradicar el Sarampión en Colombia para el año 2000.
- Eliminar el tétano neonatal para el año 2000.
- Reducir la mortalidad y morbilidad por Meningitis tuberculosa, difteria, tosferina, rubeola y rubeola congénita. Neumonías, meningitis y epiglotitis por Haemophilus Influenza tipo B y Fiebre Amarilla.
- Garantizar la vacunación gratuita y obligatoria a toda la población colombiana objeto del PAI.
- Controlar problemas de salud pública que se puedan intervenir a través de la vacunación.

En las Américas, la OPS ha diseñado una estrategia para alcanzar la meta de eliminación del sarampión, la cual consiste en:

- 1) Campaña de Vacunación de Puesta al Día, vacunando cerca de 11 millones de niños de 9 meses hasta 14 años, con lo cual se alcanzó el 97% de cumplimiento de la meta en Colombia en el año 1993.
- 2) Campañas de Seguimiento, en la que se vacunaron más de 2 millones de niños de 1 a 3 años de edad, con un cumplimiento del 97%, y una segunda campaña que se inició en abril de 1999, lográndose el 88.6% de cumplimiento al finalizar el año.
- 3) Vacunación de rutina, mantener coberturas de vacunación por encima del 95% en el programa regular de inmunización.

Hasta 1995 el Ministerio de Salud de Colombia aplicaba la vacuna antisarampionosa al cumplir los 9 meses de edad, pero a partir de ese año se comienza a aplicar la vacuna triple viral (contra el sarampión, parotiditis y rubéola) al cumplir los 12 meses de edad, esquema que sigue vigente. En 1997 se comenzó a administrar una dosis de refuerzo a los 10 años de edad, con el objeto de avanzar en la eliminación de la rubéola congénita, sin embargo en el año 2000 el refuerzo se cambió a los 5 años de edad (OPS/OMS, 1999).

#### **1.6. Control de Calidad**

La calidad de una vacuna o de un lote de vacuna no depende solamente de los resultados de las pruebas de laboratorio. La calidad comienza durante el proceso de

fabricación, con la selección del lote semilla (la cepa de bacteria o virus que se usa para iniciar el crecimiento y que conducirá al producto final), los medios de cultivo, los reactivos y la calidad del proceso de fabricación (cumplimiento de las prácticas adecuadas de fabricación). El control de calidad de una vacuna abarca dos componentes principales: la prueba de seguridad o inocuidad y la prueba de potencia o eficacia de la vacuna (PAI, 1998).

#### 1.6.1. Prueba de Inocuidad

La evaluación de la seguridad garantiza que la vacuna no contenga ingredientes perjudiciales para los seres humanos o los animales, se realizan pruebas para resolver cada uno de estos problemas:

- a. Pruebas específicas para detectar la toxicidad residual (en el caso de los toxoides) o la virulencia (inactivación incompleta de la cepa de la vacuna).
- b. Las pruebas de seguridad pueden abarcar también pruebas de identidad para comprobar que el antígeno de la vacuna sea el que se indica en la etiqueta.
- c. Durante el proceso de producción se agregan productos químicos y otras sustancias a la vacuna: antiespumantes, inactivadores, solventes, reactivos químicos, adyuvantes y/o conservantes. La concentración de estos agentes por lo general se controla por medio de pruebas químicas que garantizan que la concentración se encuentra dentro de las especificaciones aceptadas.
- d. Puede haber otros productos químicos agregados accidentalmente debido a la contaminación de instrumentos o reactivos que pasen desapercibidos. Para eso se ha ideado la prueba de toxicidad anormal o de inocuidad.
- e. Los substratos que se usan para los procesos de fermentación o de crecimiento celular constituyen un factor de riesgo especial. Los componentes de origen animal de los medios de cultivo podrían estar contaminados con microorganismos o con subproductos que constituyan una amenaza grave para la salud humana. Por lo

tanto, se presta atención a la detección de la contaminación microbiana por medio de la prueba de esterilidad.

f. La contaminación por microorganismos durante el proceso de producción se puede vigilar también con la prueba de pirógenos o la prueba de endotoxinas, que detecta componentes de la membrana (lipopolisacáridos) de bacterias Gram negativas (PAI, 1998).

#### 1.6.2. Prueba de Potencia

Uno de los requisitos para que una vacuna sea eficaz es que induzca inmunidad protectora tras su administración. La potencia de una preparación biológica se comprueba en principio durante el procedimiento de autorización por medio de los ensayos clínicos. El fabricante de la vacuna y la entidad regulatoria se enfrentan luego con el problema de cómo se evalúa la potencia de cada lote de vacuna que debe ser sometido a prueba y liberado para su uso. En general, aunque se comprenden mejor los aspectos fundamentales de la adquisición de inmunidad (celular y humoral) para vacunas específicas, todavía resulta difícil idear una prueba exacta que pueda proveer información sobre la potencia de una vacuna (PAI, 1998).

Es preciso tener en cuenta también que hay varios factores que pueden influir en la potencia de una vacuna, como la presencia de un adyuvante y su calidad, el lugar y la vía de administración y la combinación con otros antígenos (PAI, 1998).

La prueba depende en principio del tipo de vacuna, ya que hay grandes diferencias entre las vacunas de virus vivo y las de virus inactivado, así como entre las vacunas bacterianas y virales. En el caso de las vacunas de virus vivo, la potencia de cada lote está relacionada con la cantidad de partículas vivas que contenga la vacuna. En una vacuna bacteriana (como la BCG o la vacuna de bacterias vivas atenuadas, *Salmonella typhi* Ty21a), la potencia se mide según el número de unidades formadoras de colonias por dosis de vacuna y en una vacuna viral (fiebre amarilla, poliomielitis, sarampión), según la cantidad de unidades formadoras de placas por

dosis de vacuna. Se diluye la vacuna y se inocula en placas de agar apropiadas para cultivos de bacterias y en cultivos celulares en el caso de los virus. Después de un cierto tiempo, se cuentan las colonias de bacterias o las placas de virus, partiendo del supuesto de que cada colonia o placa deriva de una bacteria o virus de la dilución inoculada. En el caso de las vacunas de virus vivo, un procedimiento más común para determinar la potencia consiste en determinar la Dosis Infecciosa Media en Tejido Celular ( $DICT_{50}$ ), que es la cantidad de una suspensión viral que se calcula que infecta al 50% de las células y está correlacionada con la cantidad de partículas virales presentes (PAI, 1998).

Para las vacunas inactivadas, hay que hacer una distinción entre la determinación de la cantidad de antígeno presente en cada dosis de vacuna (prueba de antigenicidad) y la capacidad para inducir inmunidad protectora (prueba de inmunogenicidad). Aunque existe una correlación entre ambas, no es necesariamente constante. Por analogía con los productos médicos sintéticos, basta demostrar que una vacuna contiene una cantidad mínima determinada del componente eficaz. Se pueden usar pruebas in vitro o la determinación del contenido de antígeno para las pruebas de potencia de las vacunas nuevas y bien definidas que no contienen partículas vivas, sino agentes purificados (por ejemplo, vacunas de polisacáridos, vacuna contra la influenza, vacunas conjugadas como la Hib, vacuna contra la hepatitis B.) En general, los componentes responsables de la eficacia de la mayoría de los productos inmunobiológicos no se conocen o probablemente todavía no se han descrito bien. Por lo tanto, las pruebas de potencia se llevan a cabo por medio de las pruebas de inmunogenicidad (PAI, 1998).

La prueba de inmunogenicidad se basa en la inducción y medición de la respuesta inmunitaria cuando se inyecta una vacuna en un animal de laboratorio. Las pruebas de inmunogenicidad, son artificiales en cuanto a su estructura y desempeño. Idear una prueba con animales de laboratorio implica un esfuerzo considerable, y la pertinencia del modelo se puede evaluar únicamente después de validarla comparándola con resultados de los estudios clínicos realizados en seres humanos (PAI, 1998).



Se pueden realizar dos tipos de pruebas: a) se vacuna a varios grupos de animales con diluciones seriadas de vacuna y después se expone a los animales al microorganismo o la toxina correspondiente, o; b) se inyecta a un grupo de animales y después de cierto tiempo, se les extrae sangre y se miden los títulos de anticuerpos específicos (PAI, 1998).

En estas pruebas, la respuesta de un grupo de animales se usa para prever la respuesta de toda una población. Debido a las diferencias individuales de cada animal, generalmente se necesitan muchos para garantizar la confiabilidad de los resultados. El tipo, la cepa y la calidad del animal utilizado, su alimentación, el ambiente y las instalaciones de laboratorio influyen directamente en los resultados de estas valoraciones (PAI, 1998).

Además de los problemas éticos con las pruebas en animales, hay otros aspectos importantes relacionados con la seguridad, así como de índole económica y práctica, que han impulsado una iniciativa para reemplazar a los animales en diversas pruebas con otras valoraciones válidas (PAI, 1998).

#### 1.6.2.1. Medida de la Potencia de la Vacuna de Sarampión

Los requisitos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) describen dos alternativas para la determinación la potencia de la vacuna viva del sarampión: por unidades formadoras de placa (UFP) o determinación de la Dosis Infecciosa Media en Tejido Celular (DICT<sub>50</sub>), ambos métodos se realizan en células Vero. La medida de la potencia puede variar dependiendo del método de determinación, el laboratorio, y de las condiciones en el momento de la prueba. Se puede utilizar un reactivo internacional de referencia, para ayudar a estandarizar las medidas de la potencia (OMS, 1993).

En 1988, la OMS recomendó que se debe determinar individualmente el contenido de virus en cada uno de por lo menos 3 frascos seleccionados al azar de cada lote. La autoridad nacional del control determinará el contenido mínimo del virus vacunal que debe estar contenido en una dosis humana. La cantidad mínima del virus que

debe ser contenido en una dosis humana se considera generalmente 1000 unidades infecciosas virales (OMS, 1993).

Para demostrar que las vacunas cumplen con los requisitos de potencia y de estabilidad de la OMS, se debe probar la vacuna de prueba y dos frascos de la vacuna de referencia en paralelo. Para que el análisis sea considerado válido, el nivel de la vacuna de la referencia según lo medido en el laboratorio no debe desviarse más de 0.5 log del título establecido y la variación entre los dos frascos de vacuna de la prueba o los dos frascos de la vacuna de la referencia no debe exceder  $10^{0.5}$  (OMS, 1993).

## 2. JUSTIFICACION

El sarampión es una enfermedad viral altamente contagiosa, considerada propia de la infancia. El virus del sarampión es responsable de más del 10 % del total de defunciones de menores de 5 años que se producen en el mundo anualmente, de las cuales la mitad corresponde a menores de 1 año. Se reconoce que el sarampión constituye una importante causa de morbilidad y mortalidad entre niños pertenecientes a grupos de bajo nivel socioeconómico.

El esquema básico de vacunación contra el sarampión y la rubéola (combinada como vacuna triple viral, SRP) corresponde a una dosis a partir de los 12 meses, aunque algunos países la administran a los 15 o 18 meses de edad. Para la eliminación de la rubéola las estrategias de vacunación usando vacuna combinada Sarampión-Rubéola (SR) o Sarampión Rubéola y Parotiditis (SRP) son complementarias con la eliminación del sarampión.

En Colombia la estrategia de vacunación ha sido consideradas como exitosas siempre teniendo en cuenta el alcance en el cumplimiento de la meta, a consecuencia del despliegue y el gran esfuerzo técnico y profesional que se lleva a cabo, no obstante después de realizar dichas campañas no se evalúan indicadores como título de seroconversión o proporciones de seropositividad que afirmen dicho éxito.

Según los reportes del CDC (Centro de Control de Enfermedades) del 2% a 5% de los de los vacunados no responden a la primera dosis. La no respuesta aún teniendo altas coberturas de vacunación puede ser debido a: 1) Presencia de anticuerpos maternos que neutralicen al virus vacunal. 2) Baja capacidad de respuesta inmunológica por parte del huésped. 3) Contacto previo con el virus salvaje o vacunal 4) Alteraciones en el biológico y 5) Errores en la técnica de aplicación.

En trabajos anteriores realizados en la población infantil en tres centros de vacunación en Bogotá, tanto en periodo preepidémico como en periodo postepidémico se pudo observar la baja seropositividad contra el sarampión (85% y 50% respectivamente) en niños vacunados aún controlando los factores relacionados con el huésped anteriormente mencionados (IQUEN, 2002). Estas cifras sugieren la búsqueda de otro posible factor condicional que este asociado a esta baja respuesta. El factor que queda por evaluar es el biológico empleado para estas inmunizaciones que se cree sea el causante de las bajas tasas de seroconversión por tanto es necesario evaluar el desempeño del biológico in-vitro midiendo potencia de la vacuna utilizada en el Programa Ampliado de Inmunización PAI Colombia.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Determinar la potencia del componente "sarampión" de la vacuna bivalente (Vacuna de virus vivo de Sarampión y Rubéola U.S.P), empleada durante la Jornada Nacional de Vacunación 2005, mediante la técnica de microtitulación en placa.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Comparar la potencia de la vacuna obtenida en el ensayo, con la especificada en el inserto del fabricante.
  
- Calcular la concordancia interlote de las vacunas en estudio para evaluar la variabilidad de la potencia.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Tipo de Estudio**

Es un estudio de tipo observacional descriptivo, que pretende verificar si la vacuna bivalente (Vacuna de virus vivo de Sarampión y Rubéola U.S.P.) mantiene las especificaciones de 1000 DICT<sub>50</sub>.

### **4.2. Muestra**

La población objeto de estudio estuvo compuesta por lotes de vacuna de virus vivo de sarampión y rubéola U.S.P. proveniente del Serum Institute of India L.T.D. Para estimar el tamaño de la muestra se tomo como base lo descrito por la United States Pharmacopeia de 1994, en la que se propone la evaluación de potencia de vacuna con 20 muestras obtenidas de forma aleatoria de cada lote de vacuna. Adicionalmente se consulto la Serie de informes técnicos de la OMS de 1994 donde proponen hacer la determinación de la vacuna en 3 viales de cada lote. Por lo tanto se hizo un muestreo polietápico tomando inicialmente 20 viales de vacuna por lote y posteriormente se evaluaron 3 viales de estos en dos días diferentes.

Cada frasco de vacuna obtenido de las diferentes regiones del país, será registrado con el lote, la fecha de expedición y la fecha de vencimiento. El biológico se almacenará hasta el momento del análisis según indicaciones del fabricante.

### **4.3 Variables**

VARIABLES DEPENDIENTES:

Dosis infecciosa en cultivo de células (Titulo viral de la vacuna, calculado por microtitulación en placa).

VARIABLES INDEPENDIENTES:

Tipo de vacuna utilizada (Bivalente).

#### 4.4. Procedimiento

La potencia de la vacuna viva del sarampión se determinará mediante la técnica de microtitulación en placa, tomada del manual de métodos de laboratorio para pruebas de vacunas usadas en el PAI (OPS, 1994). Las diluciones de la vacuna a probar, son inoculadas en filas de 8 pozos de las placas de microtitulación, junto con la suspensión de células Vero obtenidas por tripsinización (Ver Anexo 2). Las placas son incubadas a 36°C por 7 a 9 días. Durante este periodo de incubación, a partir del cuarto día, se puede observar en las células cambios citopáticos, estos pozos se reportan como positivos. El título en DICT<sub>50</sub> (Dosis infecciosa en cultivo de células 50%) se calcula por el método de Reed-Muench (OMS, 1981).

Microtitulación en placa:

1. Reconstituir la vacuna con 0.5 ml o 5 ml de agua estéril, según se lo indicado en el rotulo de cada vial.
2. Preparar diluciones seriadas de cada una de las vacunas con el medio Eagle's MEM, como se indica en la tabla.

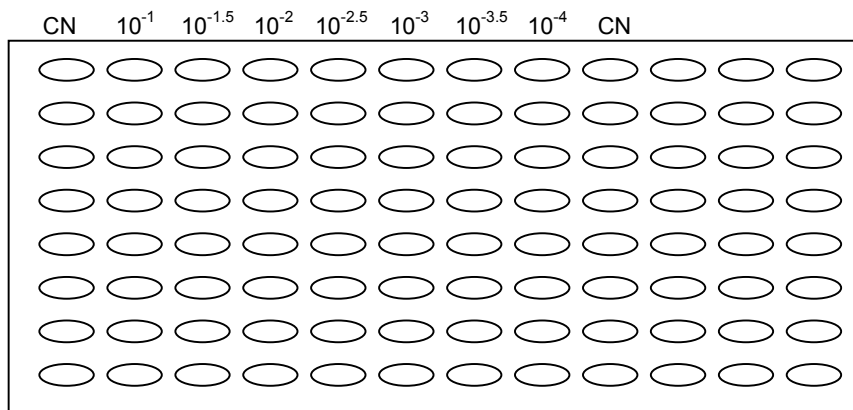
**Tabla 2.** Rango de diluciones empleadas en la prueba de potencia.

DILUCION	VOLUMEN DE DILUCION DE LA VACUNA (ml)	VOLUMEN DE DILUYENTE (ml)
10 <sup>-1.0</sup>	0.20 (de vacuna sin diluir)	1.80
10 <sup>-1.5</sup>	1.00 (de la dilución 10 <sup>-1.0</sup> )	2.16
10 <sup>-2.0</sup>	1.00 (de la dilución 10 <sup>-1.5</sup> )	2.16
10 <sup>-2.5</sup>	1.00 (de la dilución 10 <sup>-2.0</sup> )	2.16
10 <sup>-3.0</sup>	1.00 (de la dilución 10 <sup>-2.5</sup> )	2.16
10 <sup>-3.5</sup>	1.00 (de la dilución 10 <sup>-3.0</sup> )	2.16
10 <sup>-4.0</sup>	1.00 (de la dilución 10 <sup>-3.5</sup> )	2.16

**3. Montaje de la placa:**

- a) Como control negativo (CN) se utilizan las células resuspendidas en medio Eagle's MEM en 8 pozos al comienzo de la placa.
- b) Cada dilución de la vacuna se sirve en una fila de 8 pozos, como se indica en la figura.

**Figura 4.** Distribución de la placa de microtitulación para la prueba de potencia.



**4.** Agregar 50 µl del medio Eagle's MEM sin suero a la totalidad de los pozos de las diluciones de la vacuna, y 100 µl del medio a los pozos control.

**5.** Agregar 50 µl de cada dilución de la vacuna en los pozos correspondientes a cada dilución.

**6.** Agregar a todos los pozos 100 µl de la suspensión de células preparada a una concentración aproximada de 90000 células/ml (Ver Anexo 3).

**7.** Incubar las placas a 36°C por 7-9 días en incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%.

**8.** Colorear las placas con azul de metileno fenicado de la siguiente forma:

- a) Descartar el contenido de las placas.
- b) Adicionar 100 µl de la coloración a cada uno de los pozos.
- c) Dejar por 15 minutos a temperatura ambiente.



d) Descartar el colorante y enjuagar con agua destilada tres veces.

9. Observar en el microscopio la presencia de efecto citopático.

El procedimiento se debe realizar por duplicado para cada una de las vacunas y se realiza el montaje dos veces.

El título en  $DICT_{50}$  (Dosis infecciosa en cultivo de células 50%) será calculado por el método de Reed-Muench.

#### 4.5. Análisis de Datos

Para el análisis de los resultados se realizó el cálculo de la media geométrica de los títulos obtenidos de cada vial de vacuna, el cálculo de las  $DICT_{50}$  y el coeficiente de variación de cada lote. Una vez realizados estos cálculos se determinó el índice de concordancia interlote ( $\delta c$ ) mediante el programa stata 6.0.

4.5.1. Se determinó la potencia de la vacuna registrando en una tabla los datos obtenidos de las lecturas a diferentes diluciones (Tabla 3) con el fin de calcular el título de la vacuna en  $DICT_{50}$  por el método de Reed-Muench y compararlo con el título especificado por el fabricante.

**Tabla 3.** Tabla de registro de los resultados de la microtitulación en placa.

Dilución	Nº de pozos con ECP	Nº de pozos sin ECP	Total Acumulado de pozos con ECP	FAA sin ECP	Proporción	Porcentaje
$10^{-1.0}$						
$10^{-1.5}$						
$10^{-2.0}$						
$10^{-2.5}$						
$10^{-3.0}$						
$10^{-3.5}$						
$10^{-4.0}$						

4.5.1.1. Método de Reed-Muench

a. Los resultados de cada placa se registran de acuerdo con la siguiente tabla:

**Tabla 4.** Tabla de resultados de la microtitulación en placa.

Dilución	Nº de pozos con ECP	Nº de pozos sin ECP	Total Acumulado con ECP	Total Acumulado sin ECP	Proporción	Porcentaje
10 <sup>-1</sup>	8	0	16	0	16/16	100
10 <sup>-2</sup>	5	3	8	3	8/11	72.7
10 <sup>-3</sup>	3	5	3	8	3/11	27.3
10 <sup>-4</sup>	0	8	0	16	0/16	0

b. Calcular la distancia proporcional (D.P.):

$$D.P. = \frac{\% \text{ ECP en diluciones superiores al } 50\% - 50}{\% \text{ ECP en diluciones superiores al } 50\% - \% \text{ ECP en la dilución inferior al } 50\%}$$

Según la tabla anterior, la formula sería:

% ECP en diluciones superiores al 50%= 72.7%

% ECP en la dilución inferior al 50%= 27.3%

$$D.P. = \frac{72.7 - 50}{72.7 - 27.3}$$

$$D.P. = 0.50$$

c. Sumar la D.P. al logaritmo 10 del factor de dilución, de la dilución con ECP mayor al 50%, es decir sumar 0.50 a 2.

d. Al valor anterior, se le calcula el antilogaritmo, para halla el numero de DICT<sub>50</sub> para 50 µl de la vacuna. En este caso el antilogaritmo de 2.5 es 316, entonces en 50 µl de la vacuna contienen 316 DICT<sub>50</sub>.

e. Calcular el número de DICT<sub>50</sub> por dosis humana de la vacuna (500 µl). Por lo tanto en este caso el titulo seria 3160 DICT<sub>50</sub>/dosis.

4.5.2. Se realizó una prueba de hipótesis para la media con el fin de determinar si el promedio de  $DICT_{50}$  obtenido en la titulación es mayor al reportado por el fabricante, para esto se plantearon las siguientes hipótesis:

$$H_0: \mu \leq 1000 DICT_{50}$$

$$H_1: \mu > 1000 DICT_{50}$$

Adicionalmente se realizó un análisis de concordancia calculando el índice de correlación de concordancia ( $\delta_c$ ), para determinar si los datos obtenidos de cada lote se desvían significativamente de la línea de concordancia perfecta (línea con pendiente de  $45^\circ$ ). Para esto fue importante tener en cuenta los intervalos del índice de correlación de concordancia:

De 0 - 0.2	Concordancia débil
De 0.2 - 0.4	Concordancia buena
De 0.4 - 0.6	Moderadamente buena
De 0.6 - 0.8	Sustancialmente buena
De 0.8 - 1	Concordancia casi perfecta

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Vacunas analizadas (Número y lote)

Durante la Jornada Nacional de vacunación, se utilizaron vacunas Sarampión-Rubéola (bivalente) producidas por los laboratorios Serum Institute of India LTD y Berna Biotech S.A, obtenidas de diferentes regiones del país. En la siguiente tabla se presenta el numero de vacunas que fueron probadas, de acuerdo a su lote y lugar de procedencia.

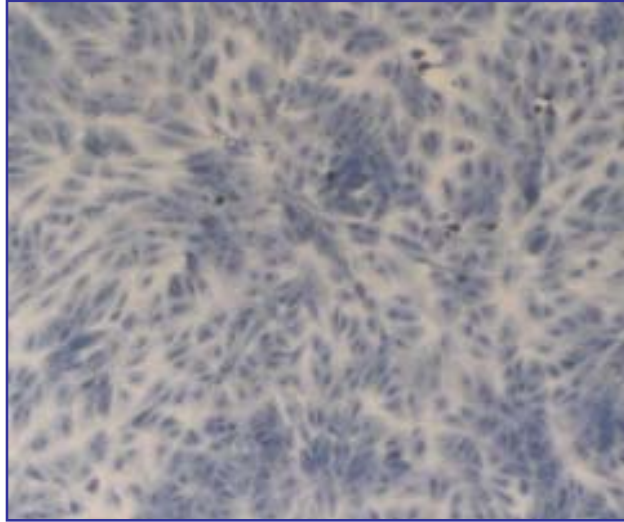
**Tabla 5.** Número de vacunas analizadas de acuerdo al fabricante, lote y procedencia.

FABRICANTE	LOTE	N° VACUNAS ANALIZADAS	PROCEDENCIA
Serum Institute of India LTD	EU 902-X	6	Yopal (Casanare)
	EU 903-X	6	Yopal (Casanare)
	EU 769	6	Madrid (Cundinamarca)
	EU 754	6	Cartagena (Bolívar) Arauca (Arauca)
Berna Biotech S.A	3000449	2	Ibagué (Tolima) Bogotá (Cundinamarca)

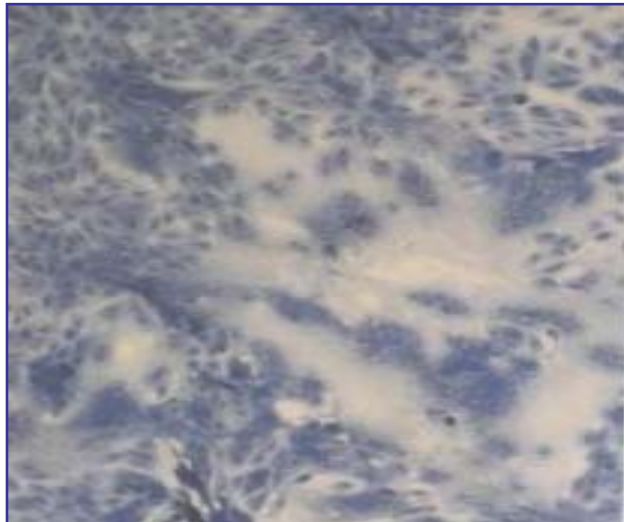
### 5.2. Resultados de la Prueba de Potencia

#### 5.2.1. Formación de Células Gigantes Multinucleadas

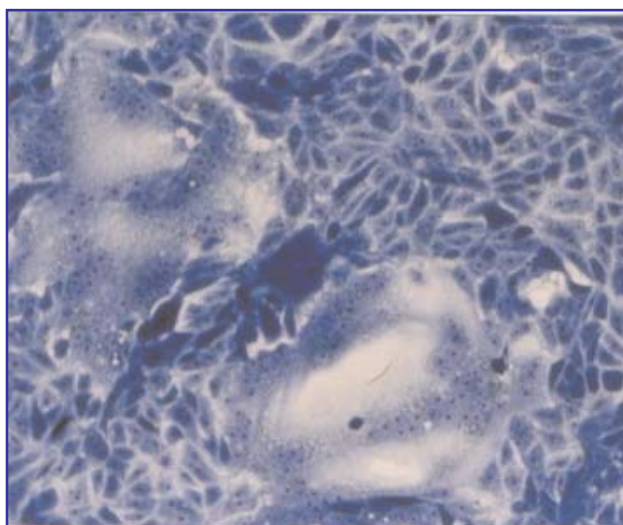
La presencia de partículas virales en la vacuna, dio como resultado la aparición de efecto citopático (ECP) en las células Vero infectadas con el virus del sarampión. En la Figura 5 , se observa una monocapa de células Vero sin ECP (control de células), mientras que en las Figuras 6 y 7 se observa claramente la presencia de ECP en las células teñidas.



**Figura 5.** Monocapa confluyente de células Vero sin efecto citopático (50X).



**Figura 6.** Monocapa confluyente de células Vero con efecto citopático (syncitio) (50X).



**Figura 7.** Monocapa confluyente de células Vero con efecto citopático (sincitio) (50X).

#### 5.2.2. Cálculos

Los cálculos de la potencia por lotes de vacuna se observan en las tablas 5 a 9, así como los resultados de la variabilidad intralote medida como coeficiente de variación (CV).

Para el cálculo del título en  $DICT_{50}$  se empleó el método de Reed-Muench detallado mas adelante.

**Tabla 6.** Distribución de los valores de  $DICT_{50}$  para las vacuna analizadas del lote EU754 (Cartagena / Arauca).

Numero de Vacuna	Media Geométrica del Titulo de la Vacuna	$DICT_{50}$
EU 754-1	$10^{2,529}$	3383
EU 754-2	$10^{2,335}$	2161
EU 754-3	$10^{2,203}$	1597
EU 754-4	$10^{2,309}$	2035
EU 754-5	$10^{2,426}$	2669
EU 754-6	$10^{2,350}$	2236
<b>Coeficiente de Variación</b>		26,15

**Tabla 7.** Distribución de los valores de DICT<sub>50</sub> para las vacunas analizadas del lote EU902 X (Yopal).

Numero de Vacuna	Media Geométrica del Título de la Vacuna	DICT <sub>50</sub>
EU 902 X-1	10 <sup>2,587</sup>	3861
EU 902 X-2	10 <sup>2,205</sup>	1602
EU 902 X-3	10 <sup>2,419</sup>	2627
EU 902 X-4	10 <sup>2,218</sup>	1651
EU 902 X-5	10 <sup>2,093</sup>	1238
EU 902 X-6	10 <sup>2,155</sup>	1428
<b>Coficiente de Variación</b>		<b>48,44</b>

**Tabla 8.** Distribución de los valores de DICT<sub>50</sub> para las vacunas analizadas del lote EU903 X (Yopal).

Numero de Vacuna	Media Geométrica del Título de la Vacuna	DICT <sub>50</sub>
EU 903 X-1	10 <sup>1,840</sup>	692
EU 903 X-2	10 <sup>2,077</sup>	1193
EU 903 X-3	10 <sup>1,897</sup>	790
EU 903 X-4	10 <sup>2,174</sup>	1494
EU 903 X-5	10 <sup>2,129</sup>	1345
EU 903 X-6	10 <sup>1,972</sup>	937
<b>Coficiente de Variación</b>		<b>29,70</b>

**Tabla 9.** Distribución de los valores de DICT<sub>50</sub> para las vacunas analizadas del lote EU769 (Madrid).

Numero de Vacuna	Media Geométrica del Título de la Vacuna	DICT <sub>50</sub>
EU 769-1	10 <sup>2,139</sup>	1377
EU 769-2	10 <sup>2,646</sup>	4429
EU 769-3	10 <sup>2,693</sup>	4931
EU 769-4	10 <sup>2,693</sup>	4927
EU 769-5	10 <sup>2,731</sup>	5385
EU 769-6	10 <sup>2,545</sup>	3504
<b>Coficiente de Variación</b>		<b>36,08</b>

**Tabla 10.** Distribución de los valores de  $DICT_{50}$  para las vacuna analizadas Berna.

Numero de Vacuna	Media Geométrica del Título de la Vacuna	$DICT_{50}$
Berna-1	$10^{2,154}$	1427
Berna-2	$10^{2,300}$	1995
<b>Coficiente de Variación</b>		23,50

Adicionalmente se determinó si el valor promedio de potencia obtenido por lote en estudio era significativo con respecto a lo que indicaba la casa fabricante, para esto se desarrollo una prueba de hipótesis para la media obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 11.** Resultados de la prueba de hipótesis.

Lote	Media	p	IC95%
EU754	2346	0,0015	(1703 - 2988)
EU 902 X	2068	0,0238	(1019 - 3116)
EU 903 X	1075	0,294	(740 - 1409)
EU 769	4092	0,0018	(2544 - 5639)

\* La significancia se probó con un alfa de 0.05.

\*\* No se realizó la prueba para la vacuna Berna ya que el tamaño de la muestra no lo permitía.

#### 5.4. Análisis de Concordancia Interlote

**Tabla 12.** Resultados del análisis de concordancia interlote.

Lotes	Coficiente Rho	IC 95%
EU 754 - EU902 X	0.396	(-0.296 - 1.088)
EU 754 - EU903 X	-0.039	(-0.200 - 0.122)
EU 754 - EU 769	-0.21	(-0.61 - -0.19)
EU902 X - EU903 X	-0.212	(-0.605 - 0.181)
EU902 X - EU 769	-0.27	(-0.81 - -0.26)
EU903 X - EU 769	0.049	(0.18 - 0.11)

La concordancia de los títulos obtenidos interlote fue medida con el índice de correlación de concordancia ( $\delta_c$ ). Únicamente los lotes EU 754 y EU902 X



presentan una concordancia buena, los demás lotes probados presentan una concordancia débil.

## 6. DISCUSION

Un factor clave para el éxito y la eficacia de los programas de vacunación, además de la disponibilidad de infraestructura, logística y recursos humanos adecuados, es la utilización de vacunas de calidad. El empleo de una vacuna de potencia baja o inocuidad desconocida pone en peligro todos los demás esfuerzos y recursos invertidos para lograr una cobertura de vacunación alta (OPS/OMS, 2000). Por ello, es muy importante el establecimiento y fortalecimiento de mecanismos que le permitan al país garantizar la utilización de vacunas de buena calidad.

La variabilidad intrínseca inherente a la fabricación de biológicos, implica que sus características puedan variar de lote a lote. La prueba de potencia de los lotes de una vacuna, es por lo tanto, una prueba importante dentro del control final del producto para garantizar la consistencia dentro del proceso de producción (McVey et al., 2003).

La técnica utilizada en este estudio, para la determinación de la potencia de la vacuna, fue tomada del “Manual de Métodos de laboratorio para pruebas de vacunas usadas en el Programa Ampliado de Inmunización (PAI)” (OMS, 1997). En nuestros ensayos no se modificó el protocolo, únicamente después del periodo de incubación de las placas, estas fueron coloreadas con azul de metileno fenicado según lo descrito por Nates et al., con el fin de facilitar la observación del efecto citopático (Figuras 5 y 6) que se da como consecuencia de la fusión de células, inducida por el virus del sarampión (Nates et al., 1994), observando claramente las células gigantes multinucleadas (sincitios), con gran cantidad de núcleos en el centro. La utilización de este protocolo nos permitió obtener resultados altamente confiables y reproducibles.

La lectura de placas supone un grado de experticia por parte del observador la cual fue considerada por el grupo de investigación al realizarse dicha lectura por tres observadores diferentes obteniéndose los mismos resultados.

Es bien discutido que en este tipo de técnicas existen interferencias principalmente si se realiza sobre vacunas multivalentes, en las cuales se supone que los demás virus presentes pueden ejercer alteraciones en dos sentidos: a) Inhibición en la replicación de virus y b) Formación adicional del efecto citopático. En cuanto al primer punto, estudios previos de potencia realizados con vacuna trivalente demostraron que, para el virus del sarampión no se da interferencia entre los diferentes componentes de la vacuna en cultivo de células Vero, ya que no se inhibe la replicación del virus del sarampión por la presencia de los virus de rubéola o parotiditis (Fukuda et al., 1990; Schalk et al., 2005). En cuanto a la formación adicional de efecto citopático, el virus de la rubéola produce un efecto muy débil en las células de Vero. (Grutadauria et al., 1998), por lo cual es difícil de evidenciar bajo las condiciones de este ensayo, y se considera que la formación de sincitios fue causada solamente por el virus del sarampión.

Un punto adicional al control de la técnica tiene que ver con la precisión de los resultados ya que se debe tener en cuenta que las dos titulaciones obtenidas de una misma vacuna no difieran en más de  $10^{0.5}$  (OMS, 1997) En nuestros ensayos los resultados obtenidos se encuentran dentro de este parámetro.

Teniendo en cuenta que los posibles sesgos producidos por la técnica fueron controlados por lo anteriormente mencionado, se observó que los títulos obtenidos a partir de la prueba de potencia presentaban muy baja concordancia entre los diferentes lotes, así como entre los títulos obtenidos de los viales de un mismo lote de vacuna. Esta variación en los títulos puede ser debido a factores como el mantenimiento de la cadena de frío durante el almacenamiento, transporte o distribución de la vacuna a los diferentes puntos de vacunación en todo el país.

La baja concordancia de los títulos interlote, puede también ser consecuencia de una falta de consistencia durante el proceso de producción de la vacuna, ya que un

proceso de producción debidamente validado, permite obtener un producto uniforme. Eso significa que las características críticas de la vacuna, generalmente medidas por las especificaciones del producto durante el proceso y en el producto final, están siempre presentes en las distintas series de producción. Así pues, las pruebas en el producto final se convierten en una demostración de la uniformidad de la producción, con el fin de garantizar que cada uno de los lotes posea las mismas características de un lote cuya inocuidad y eficacia han sido demostradas en los ensayos clínicos (Dellepiane, 2000). Adicionalmente los ensayos de potencia pueden producir efectos sobre la variabilidad intra e interlote debido probablemente a errores sistemáticos en la medición.

En cuanto a la potencia de las vacunas, todos los lotes, excepto el lote EU903 X, cumplieron con el mínimo de 1000 DICT<sub>50</sub> establecidas por el fabricante ( $p = 0.94$ ) y el lote EU902 X, aunque fue estadísticamente significativo ( $p = 0.02$ ), presentó los valores promedio más bajos de potencia.

Según lo establecido para el manejo de biológicos (Arya et al., 2003), la vacuna liofilizada pierde potencia durante el almacenamiento a altas temperaturas. Su vida media entre 25°C y 30°C, 37°C o 41°C es 31 días, 16.6 días, o 3.3 días respectivamente, teniendo en cuenta que la procedencia de estos lotes es de la ciudad de Yopal, es posible afirmar que las condiciones climáticas y geográficas de esta ciudad pueden afectar el biológico bien sea por fallas en la cadena de frío, en el mantenimiento de estos o en el uso al momento de la vacunación. Razones que pueden hacer pensar que estos lotes no tuvieron adecuadas condiciones de manipulación.

Las repercusiones en la población que es vacunada con lotes de baja potencia pueden ser cruciales en los resultados del éxito a largo plazo de una jornada de vacunación, ya que estos individuos no desarrollarían anticuerpos capaces de generar respuesta inmune adecuada que controle un brote. Es posible, que incluso una pequeña disminución de la potencia de la vacuna pueda comprometer la eficacia de esta, especialmente en regiones con alta incidencia de la enfermedad (McVey et al., 2003). Adicionalmente, aunque el título de anticuerpos inducidos por

la vacunación es más bajo que tras la infección natural, los niveles de anticuerpos que desarrolla una persona después de la primera inmunización también son mas bajos. Sin embargo, los estudios indican que aunque la revacunación puede aumentar el título de anticuerpos en algunas personas, este titulo no es sostenido con el tiempo (CDC, 2006).

En un estudio paralelo a este, realizado durante la Jornada Nacional de Vacunación 2005, en población entre 14 y 39 años de edad, se demostró que existe una gran proporción de anticuerpos prevacunales, indicando inmunidad previa por contacto con el virus salvaje o con el virus vacunal (población mayor de 27 años) posiblemente debido a la continua exposición a este en campañas nacionales que se han realizado periódicamente en el país desde 1993 que alcanzan coberturas hasta del 97% en el grupo de edad de 9 meses a 14 años (Mercado, 2006), población que al 2005 entro en la cohorte de vacunados. Además, en el mismo estudio no se observó aumento en el titulo de anticuerpos antes y después de la vacunación, a pesar de que la prueba de potencia realizada al biológico empleado durante esta campaña de vacunación muestra que este cumple con las especificaciones dadas por la OMS.

## 7. CONCLUSIONES

La técnica utilizada para la determinación de la potencia de las vacunas, fue adecuada y puede ser utilizada por las autoridades reguladoras nacionales, para realizar las pruebas de control de las vacunas.

Los lotes de vacuna producidos por el Serum Institute of India LTD presentaron baja concordancia entre si.

El lote EU903 X (proveniente de Yopal), no cumple con las especificaciones de  $DICT_{50}$  previamente descritas por el fabricante.

La utilización de vacunas en el país, debe tener un adecuado control que pueda garantizar la calidad y seguridad de las mismas, así como las condiciones de distribución y uso de la vacuna en los diferentes puntos de vacunación.

## **8. RECOMENDACIONES**

Es necesario que la institución competente en el país, realice las pruebas de control para la liberación de cada lote de vacunas usado en las campañas de vacunación, que realice inspecciones de los fabricantes para evaluar el cumplimiento de las prácticas adecuadas de fabricación; y se ponga en práctica un sistema de vigilancia durante la distribución del producto a las diferentes regiones del país.

Se recomienda estandarizar la técnica para la microtitulación en placa del virus de la rubéola en cultivo de células RK13, para ser realizada paralelamente con la titulación del virus del sarampión para el control de calidad de las vacunas bivalentes que se utilicen en el país.

## BIBLIOGRAFIA

Álvarez, E., Paláu, J. 1997. Infecciones en pediatría. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana. pp 894.

Arya, S., Agarwal, N. 2004. Efficacy of measles vaccine interlinked with potency and storage. *Acta Tropica* 90. pp 223 - 225.

American Type Culture Collection. 1992. Catalogue of cell lines and hybridomas. Séptima Edición. Maryland.

Ayala, S. Naranjo, A., Mercado, M. 2004. Determinación de las tasas de seropositividad contra el sarampión en mujeres y respuesta de anticuerpos pre y postvacunales de sus hijos entre 6 y 12 meses de edad. Pontificia Universidad Javeriana.

Bhella D., Ralph A., Murphy L., Yeo R. 2002. Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae. *Journal of General Virology* 83, pp 1831-1839.

Cáceres, F., Silva, C., Serrano, M., Fontecha, L., Betancourt, L., Salazar, J., Ruiz, D., Sánchez, J., Hernández, L. 2003. Cobertura de vacunación contra sarampión en menores de 5 años, comuna Provenza, Bucaramanga. *MedUNAB* 2003; 6(17):76-79.

Carballo, M., García, M., Galindo, M. 1998. El sarampión: una realidad y un desafío. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*; Vol 36(3):169-78.

Centers for Disease Control. 2006. Measles. Disponible en: <[www.cdc.gov/nip/publications/pink/meas.pdf](http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/meas.pdf)> [Consulta: Julio 27 de 2006].



Dellepiane, N., Griffiths, E., Milstien, J.B. 2000. Nuevos retos para asegurar la calidad de las vacunas. *Bulletin of the World Health Organization*, 78 (2): 155–162.

Duke, T., Mgone, C. 2003. Measles: not just another viral exanthem. *Lancet* 361, pp 763–73.

Escobar, A. Valdespino J, Sepúlveda J. 1992. Vacunas: ciencia y salud. Secretaria de Salud. México. pp 143 -161.

Expert Reviews in molecular medicine. 2002. Disponible en: <<http://www.expertreviews.org/>>. [Consulta: Septiembre 14 de 2006].

Fukuda, A., Umino, Y., Saito, S., Hishiyama, M., Sugiura, A. 1990. Improvement in potency assay of measles-mumps-rubella trivalent vaccine: interference between components and measures for its elimination. *Journal of Virological Methods*. 27, 159-168.

Garly, M., Aaby, P. 2003. The challenge of improving the efficacy of measles vaccine. *Acta Tropica* Vol 85, pp 1-17.

Grutadauria, S., Cordoba, P., Cuffini, C., Zapata, M. 1998. Cell-fusion assay for the detection of rubella virus in Vero cells. *Clinical and diagnostic virology*. Mayo 1;10(1):9-16.

Hilleman, M. 2002. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine* Vol 20, pp 651–665.

Informe Quincenal Epidemiológico Nacional. Instituto Nacional de Salud. 2002. Situación del Sarampión en Colombia. Vol. 8 (8).

Knipe, D.M., Howley P., Griffin, D. 2001. *Fields Virology*. Cuarta Edición. Lippincott-Raven Publishers. Filadelfia, Estados Unidos.

Matumoto, M. 1966. Multiplication of measles virus in cell cultures. *Bacteriological Reviews*. Vol. 30, No. 1.

McVey, D., Galvin, J., Olson, S. 2003. A review of effectiveness of vaccine potency control testing. *Internacional Journal for Parasitology* 33, 507-516.

Mercado, M., Bermúdez, A., Chavez, T., Ruiz, J., Tavera, P., Rey, G. 2006. Seroprevalencia de anticuerpos contra sarampión en población entre 14 y 39 años de dos ciudades de Colombia. *Laboratorio Actual*, año 22 No 39.

Ministerio de la Protección Social (MPS). 2005. Protocolo de Vigilancia integrada Sarampión- Rubéola.

Murray, P., Pfaller, M., Rosenthal, S. 2005. *Medical Microbiology*. Quinta Edición. Mosby. pp 976.

Nates, S., Rey, G., Giordano, M., Zapata, M., Depetris, A., Boshell, J. 1994. Modified seroneutralization assay for measles virus antibody detection. *Research in Virology*, 145, 45-49.

Organización Mundial de la Salud. 1981. Manual de laboratorio para la valoración de vacunas de virus vivos por la técnica de cultivo tisular. Washington, D.C.

Organización Mundial de la Salud. Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI). 1993. *Immunological Basis for Immunization. Module 7: Measles*. pp 28.

Organización Mundial de la Salud. 1994. Serie de Informes Técnicos. No. 840, 43° Informe.

Organización Mundial de la Salud. 1997. Manual de métodos de laboratorio. Para las pruebas de vacunas usadas en el Programa Ampliado de Inmunización. Génova.

Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud. 2000. Vacunas E Inmunización. 126a Sesión del Comité Ejecutivo. Washington, D.C., Junio .

OPS/OMS Colombia. Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. 2002. Disponible en: <[http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2002/BOLE52\\_02.htm](http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2002/BOLE52_02.htm)> [Consulta: Agosto 13 de 2006].

OPS/OMS Colombia. Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI). 1999. Plan de Erradicación del Sarampión. Disponible en: <<http://www.col.ops-oms.org/pai/plansarampion.htm>> [Consulta: Diciembre 07 de 2006].

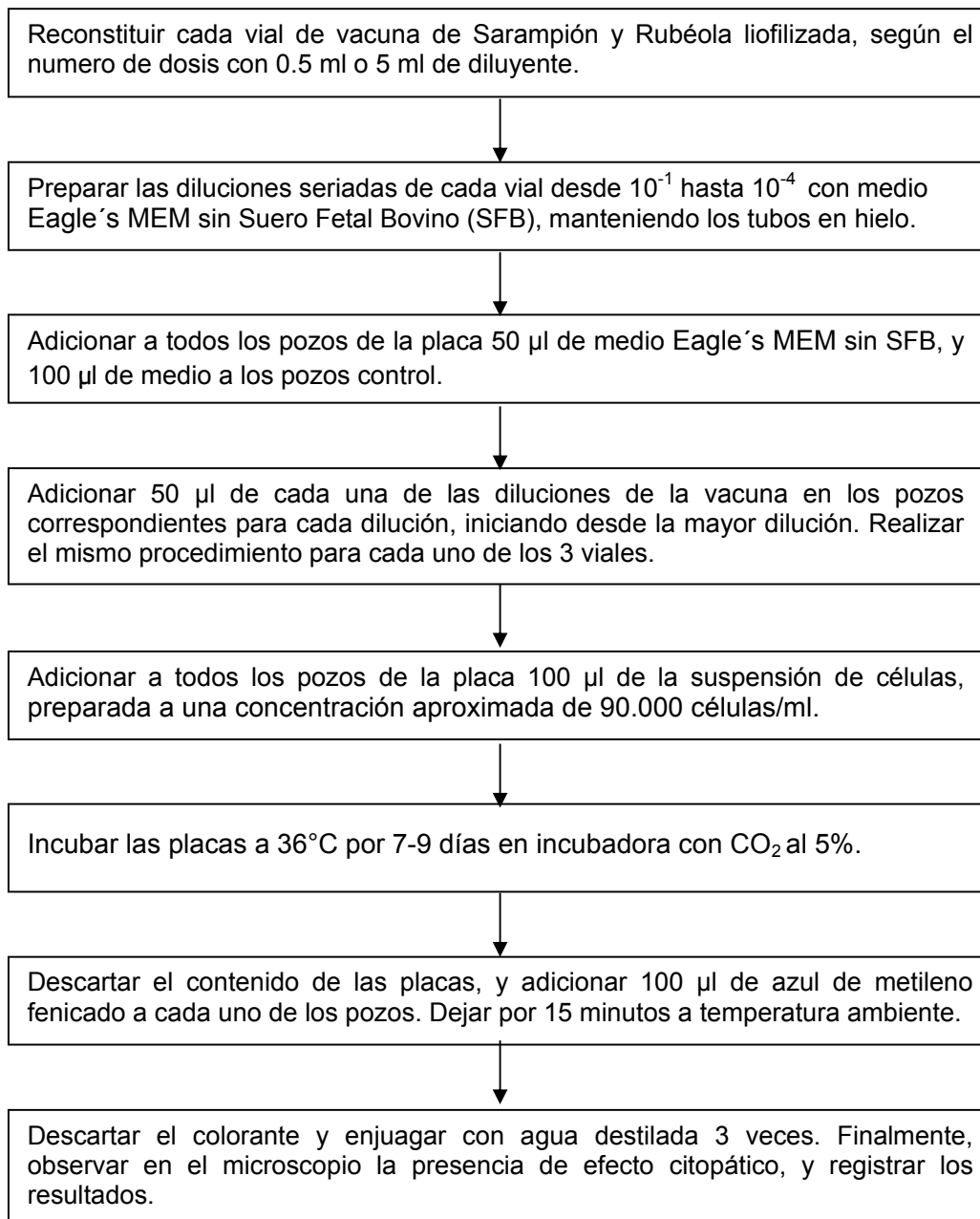
Pan American Health Organization. 2005. Measles Elimination. Field guide. Second Edition. Scientific and Technical Publication No. 605. Washington, D.C.

Boletín Informativo Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI). 1998. Programa Ampliado de Inmunización en las Américas. Febrero - Abril - Diciembre.

Ruiz, J.G., Mercado, M., Rey, G. 2005. Niveles de anticuerpos y respuesta a la vacuna de sarampión en la era postvacunal, en niños entre los 6 y 12 meses de la ciudad de Bogotá. Pediatría. Vol 40 No 4.

Schalk, J., de Vries, C., Jongen, P. 2005. Potency estimation of measles, mumps and rubella trivalent vaccines with quantitative PCR infectivity assay. Biologicals. 33, 71-79.

**ANEXO 1**  
**MICROTITULACION EN PLACA**

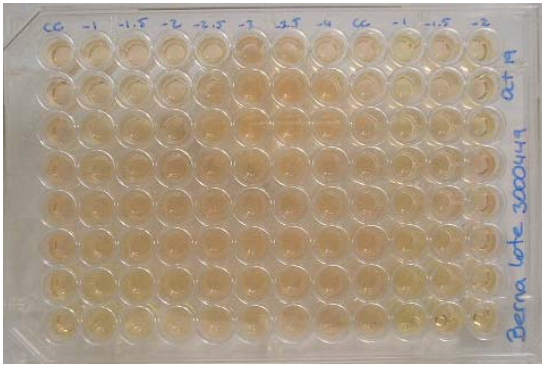




Vacunas Sarampión-Rubéola (bivalente)  
producidas por los laboratorios  
Serum Institute of India LTD.



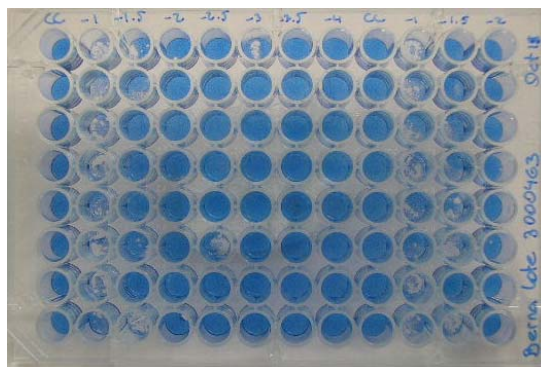
Vacunas Sarampión-Rubéola (bivalente)  
producidas por los laboratorios  
Berna Biotech S.A.



Placa de microtitulación de 96 pozos fondo  
plano.



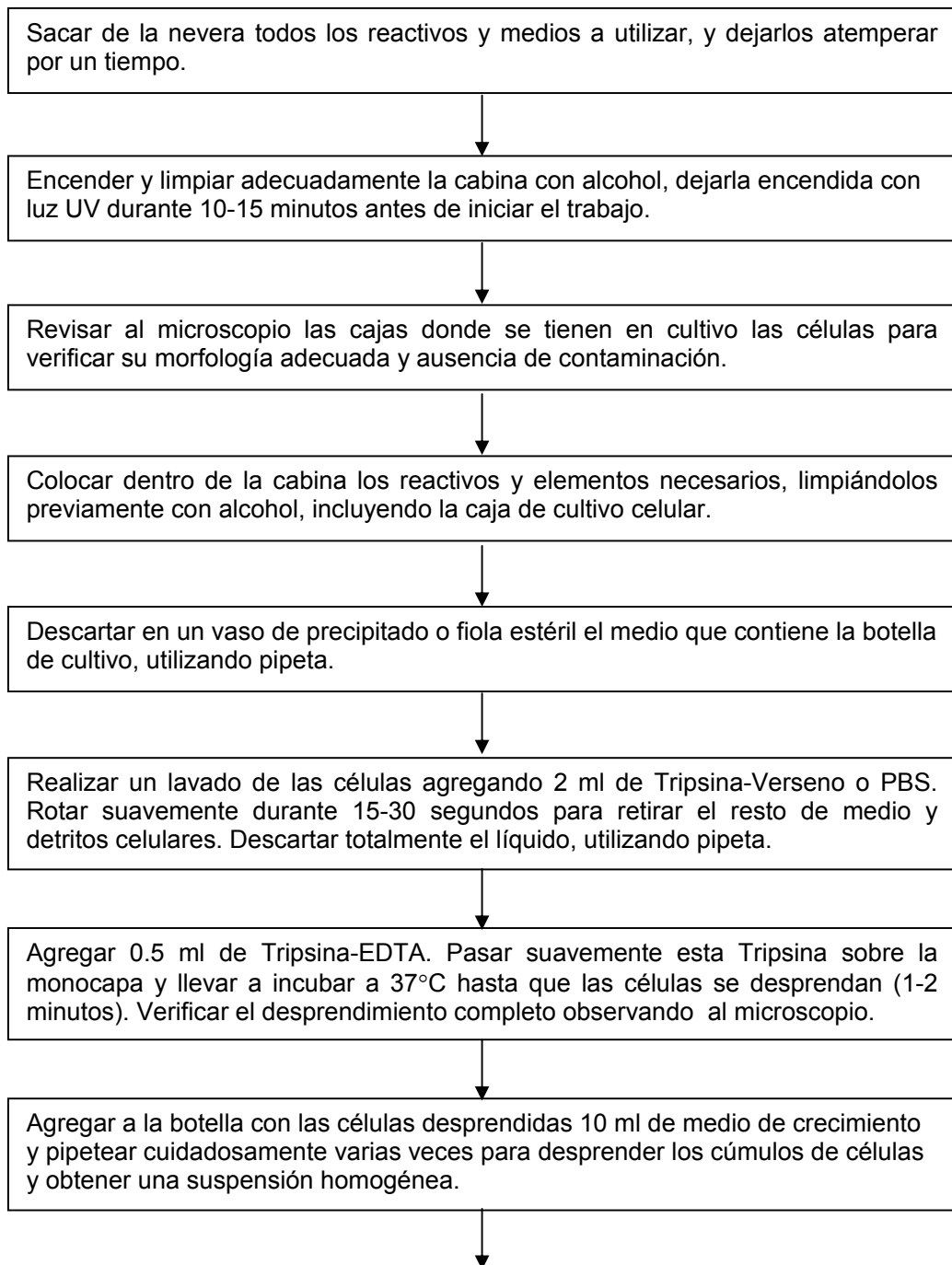
Coloración de las placas con  
Azul de Metileno Fenicado.



Placa de microtitulación coloreada.

## ANEXO 2

### MANEJO DE CÉLULAS VERO



Realizar recuento de células en cámara de Neubauer (Ver Anexo2) y agregar el volumen de medio requerido para la concentración de células esperada.



Si se requiere ampliar un cultivo de células, y cultivarlas en mas botellas, repetir el procedimiento de tripsinización y ampliación del cultivo cada vez que la monocapa formada esté confluyente Las botellas se subcultivan cada 3-7 días, a 37° C, con 5% de CO<sub>2</sub>.



Cajas de cultivo celular.



Microscopio Invertido



Incubadora de células a 36°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### ANEXO 3

#### RECUESTO DE CELULAS EN CAMARA DE NEUBAUER

Para un recuento preciso del número de células presente en una suspensión, se puede utilizar la Cámara de Neubauer; es importante que se tengan células individuales, bien separadas de otras, lo cual se favorece pipeteando varias veces la suspensión antes de hacer el recuento:

1. Realizar una dilución 1:4 de la suspensión celular con azul de tripán (0,1 ml de células + 0,3 ml de azul tripán).
2. Mezclar muy bien pipeteando varias veces. Dispensar el volumen suficiente para llenar los dos lados de la cámara.
3. Realizar recuento de células viables en cada uno de los 4 cuadrados externos cuyo borde son tres líneas, tal como se muestra en la gráfica. Las células viables se observan claras y refringentes, no son coloreadas con el azul tripán.
4. Realizar el conteo de células en la otra parte de la cámara. Para que el recuento sea válido, el promedio de los conteos realizados en cada lado de la cámara no debe diferir en más de un 20%.
5. Calcular la concentración de células viables por mililitro usando la siguiente fórmula:

$$N = t \times tb \times \frac{1}{4} \times 10^4$$

**t** = total de células viables contadas en los 4 cuadrantes

**tb** = 4 (factor de corrección de la dilución realizada con el azul tripán, que fue 1/4)

1/4 = factor de corrección para determinar el promedio del recuento realizado en los 4 cuadrantes

**10<sup>4</sup>** = factor de conversión para la cámara de Neubauer

**N** = concentración inicial de células por mililitro

Por lo tanto, se puede simplificar la fórmula así:

$$N = \text{total de células en los 4 cuadrantes} \times 10^4 / \text{ml}$$