



**DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA DEL COMPONENTE
“SARAMPIÓN” DE LA VACUNA DE VIRUS VIVO DE
SARAMPIÓN Y RUBÉOLA USP UTILIZADA EN LA
JORNADA DE VACUNACIÓN 2005**

**POTENCY OF MEASLES VIRUS BIVALENT VACCINE
(USP) TESTED DURING THE NATIONAL VACCINATION
PROGRAM IN 2005**

A. Bermúdez-Forero¹, M. Mercado-Reyes¹, P. Tavera², G. Rey-Benito²

¹ *Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana,
Carrera 7 # 43-82, Bogotá, Colombia*

² *Grupo de Virología, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 # 51-60, Bogotá, Colombia
a.bermudez@javeriana.edu.co*

Resumen

Un factor clave para el éxito y la eficacia de los programas de vacunación, es la utilización de vacunas de calidad. Este estudio se realizó con el fin de verificar si la vacuna bivalente (vacuna de virus vivo de sarampión y rubéola USP) empleada durante la Jornada Nacional de Vacunación 2005, mantenía las especificaciones de 1000 DICT₅₀. Se emplearon 6 frascos por lote de vacuna bivalente, muestreados aleatoriamente en diferentes regiones del país. Se utilizó la metodología descrita en el *Manual de métodos de laboratorio para pruebas de vacunas usadas en el Programa Ampliado de Inmunización (PAI)* de la OMS. El título de la vacuna en DICT₅₀ fue calculado por el método de Reed-Muench y se realizó una prueba de hipótesis para la media con el fin de determinar si el promedio de DICT₅₀ obtenido en la titulación era mayor o igual al reportado por el fabricante, adicionalmente se realizó un análisis de concordancia calculando el índice de correlación de concordancia interlote (δc). 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. Un solo lote muestreado en la ciudad de Yopal no cumplió con el número de dosis establecidas por el fabricante. 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 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.

Palabras clave: células vero, efecto citopático, potencia, sarampión, vacunas.

Abstract

Quality of vaccines is an imperative factor to guarantee success and effectiveness of vaccination programs. This study was done to verify if bivalent vaccine (Live attenuated measles and rubella vaccine U.S.P.) used during the National Vaccination Campaign in 2005, maintained the specifications of 1000 DICT₅₀. Six vials per vaccine lot were used. Samples were obtained from different regions of the country. Protocol described in the Manual of Laboratory Methods for testing vaccines used in the WHO Expanded Programme of Immunization was used. Titer vaccine in TCID₅₀ was calculated by the Reed-Muench method and an hypothesis test for mean TCID₅₀ obtained in the titration was performed to determine if it was greater or equal to the one reported by manufacturer. Additionally, a correlation analysis was done calculating interlot agreement correlation index (δc). Titers obtained in potency tests showed very low agreement between different lots, as well as between titers obtained from vials of the same vaccine lot. This variation in titers can occur due to factors like maintenance of cold chain during storage, transportation or distribution of vaccine through different vaccination points in the country. The technique used to determine the potency of vaccines, was suitable, and can be used by the National Regulatory Authorities, to perform tests to determine quality of vaccines.

Key words: Cytopathic effect, Measles, Potency, Vaccine, Vero cell.

INTRODUCCIÓN

El sarampión es una enfermedad infecciosa transmisible propia de la infancia, de distribución geográfica universal y entre las enfermedades inmunoprevenibles es la que mayor mortalidad causa en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año ocurren aproximadamente cuatro millones de casos de sarampión en el mundo, declarándose sólo una pequeña proporción de los mismos; la mayor parte de las muertes se presentan en los países en desarrollo, calculándose tasas de letalidad que alcanzan entre 3 y 5% incluso llegando a ser de 10 a 30% en algunos lugares. 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. (Carballo *et al.*, 1998).

A nivel mundial se han realizado múltiples esfuerzos para la erradicación de esta enfermedad. En 1995, todos 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 miembros han llevado a cabo durante estos años campañas 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 Colombia, en los últimos siete años, el Instituto Nacional de Salud y la Universidad Javeriana han realizado estudios de seroconversión al sarampión, que evaluaron 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% de seroconversión con vacuna triple viral (Ruiz *et al.*, 2005). Por otra parte en el 2004 se obtuvieron resultados de seropositividad

no mayores al 75% en mujeres entre 17 y 28 años. Los datos anteriormente citados sugieren la búsqueda de otro posible factor condicionante que se asocie a esta baja respuesta, lo cual hace necesario evaluar el desempeño del biológico determinando la potencia de la vacuna que se utiliza en el Programa Ampliado de Inmunización PAI Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño: se realizó un estudio observacional descriptivo de laboratorio para determinar la potencia de la vacuna bivalente utilizada en la Campaña Nacional de Vacunación del 2005.

Población y muestra: la población objeto de estudio estuvo compuesta por lotes de vacuna de virus vivo de sarampión y rubéola USP proveniente del Serum Institute of India LTD. Para estimar el tamaño de la muestra se tomó 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 consultó la serie de informes técnicos de la OMS de 1994 donde proponen hacer la determinación de la potencia de la vacuna en 3 viales de cada lote. Por tanto se hizo un muestreo polietápico tomando inicialmente 20 viales de vacuna por lote y posteriormente se evaluaron 3 viales de éstos en dos días diferentes.

PROCEDIMIENTO

Microtitulación en placa

La técnica de microtitulación en placa fue tomada del manual de métodos de laboratorio para pruebas de vacunas usadas en el PAI (OPS 1997). Se prepararon diluciones seriadas (desde 10^{-1} hasta 10^{-4}) de cada vial de vacuna, con medio Eagle's MEM

(Sigma) sin suero fetal bovino (SFB), los tubos fueron mantenidos en hielo hasta el momento de utilizarlos. En la placa de prueba se adicionaron 100 μ l de medio Eagle's MEM sin SFB a los pozos control y 50 μ l a los pozos restantes, posteriormente se agregaron 50 μ l de cada una de las diluciones de la vacuna en los pozos correspondientes. Previo a este procedimiento se había preparado una suspensión de células Vero (concentración aproximada de 90.000 células/ml) de las cuales se adicionaron 100 μ l por pozo. Las placas se incubaron a 36°C por 7-9 días en incubadora con CO₂ al 5%. Pasado este tiempo el contenido de las placas fue descartado y se adicionaron 100 μ l de azul de metileno fenicado a cada uno de los pozos (procedimiento adicional a lo indicado en el manual de métodos de laboratorio para pruebas de vacunas usadas en el PAI). El colorante fue dejado por 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente las placas fueron lavadas tres veces con agua destilada. Por ultimo, se observó al microscopio la presencia de efecto citopático. El título en DICT₅₀ (dosis infecciosa en cultivo de células 50%) fue calculado por el método de Reed-Muench (OMS, 1981).

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 DICT₅₀ y el coeficiente de variación de cada lote. Una vez realizados estos cálculos se determinó el índice de concordancia interlote (δc) mediante el programa stata 6.0. Para determinar si el promedio de DICT₅₀ obtenido en la titulación era mayor o igual al reportado por el fabricante se realizó una prueba de hipótesis para la media utilizando una prueba de t student.

RESULTADOS

Resultados de la prueba de potencia

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 1 (izquierda), se observa una monocapa de células Vero sin ECP (control de células), mientras que en la figura 1 (derecha) se observa claramente la presencia de ECP en las células teñidas.

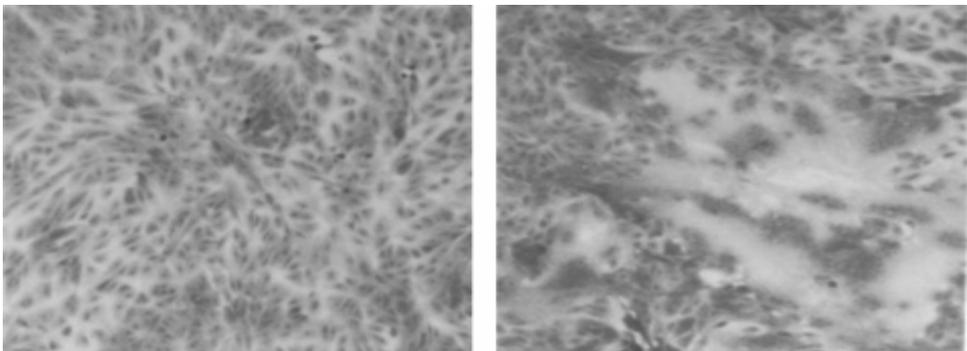


Figura 1
Formación de sincitios celulares: Control de células, monocapa de células Vero sin efecto citopático (izquierda) y presencia de efecto citopático en las células teñidas (derecha)

Los cálculos de la potencia por lotes de vacuna así como los resultados de la variabilidad intralote medida como coeficiente de variación (CV) se observan en la tabla 1. 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 desarrolló una prueba de hipótesis para la media obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 2.

Análisis de concordancia interlote

La concordancia de los títulos obtenidos interlote fue medida con el índice de correlación de concordancia (δc). Únicamente los lotes EU 754 y EU 902X presentaron una concordancia buena, los demás lotes probados presentaron una concordancia débil (tabla 3).

DISCUSIÓN

Un factor clave para el éxito y la eficacia de los programas de vacunación, entre otros factores 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).

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 tanto, una prueba importante dentro del control final del producto para garantizar la consistencia dentro del proceso de producción (McVey *et al.*, 2003).

Tabla 1
Distribución de los valores de DICT₅₀ en las vacunas analizadas por cada lote

Lote	Vacuna N°	Media geométrica del título de la vacuna	DICT ₅₀	CV
EU 754 Cartagena / Arauca	1	10 ^{2,529}	3383	26,15
	2	10 ^{2,335}	2161	
	3	10 ^{2,203}	1597	
	4	10 ^{2,309}	2035	
	5	10 ^{2,426}	2669	
	6	10 ^{2,350}	2236	
EU902 X Yopal	1	10 ^{2,587}	3861	48,44
	2	10 ^{2,205}	1602	
	3	10 ^{2,419}	2627	
	4	10 ^{2,218}	1651	
	5	10 ^{2,093}	1238	
	6	10 ^{2,155}	1428	
EU903 X Yop al	1	10 ^{1,840}	692	29,70
	2	10 ^{2,077}	1193	
	3	10 ^{1,897}	790	
	4	10 ^{2,174}	1494	
	5	10 ^{2,129}	1345	
	6	10 ^{1,972}	937	
EU769 Madrid	1	10 ^{2,139}	1377	36,08
	2	10 ^{2,646}	4429	
	3	10 ^{2,693}	4931	
	4	10 ^{2,693}	4927	
	5	10 ^{2,731}	5385	
	6	10 ^{2,545}	3504	

Tabla 2
Resultados de la prueba de hipótesis.

Lote	Media de DICT ₅₀	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 α 0,05.

Tabla 3
Resultados del análisis de concordancia interlote

Lotes	Coefficiente δc	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)
EU902X - EU903 X	-0,212	(-0,605 - 0,181)
EU902 X - EU 769	-0,27	(-0,81 - -0,26)
EU903 X - EU 769	0,049	(0,81 - 0,11)

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). La utilización de este protocolo permitió obtener resultados altamente confiables y reproducibles.

El efecto citopático que se observa en la figura 1 (derecha), 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 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 pro-

ducto 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 *et al.*, 2000). Adicionalmente los ensayos de potencia pueden producir efectos sobre la variabilidad intra e interlote debido probablemente a errores sistemáticos en la medición (por los instrumentos utilizados), errores del analista o por factores externos.

En cuanto a la potencia de las vacunas, todos los lotes, excepto el lote EU903 X, cumplieron con el mínimo de 1000 $DICT_{50}$ 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, geográficas y de orden público de esta ciudad pueden afectar el biológico bien sea por fallas en la cadena de frío, en el mantenimiento de éstos 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 ésta, especialmente en regiones con alta incidencia de la enfermedad (McVey *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

El lote EU903 X (proveniente de Yopal), no cumple con las especificaciones de DICT₅₀ previamente descritas por el fabricante.

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

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.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud, por la colaboración prestada durante el estudio y permitir el desarrollo del mismo en sus instalaciones.

LITERATURA CITADA

ARYA, S., AGARWAL, N. Efficacy of measles vaccine interlinked with potency and storage. *Acta Tropica*, 2004, 90, 223-5.

CARBALLO, M., GARCÍA, M., GALINDO, M. El sarampión: una realidad y un desafío. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 1998, 36(3), 169-78.

DELLEPIANE, N., GRIFFITHS, E., MILSTIEN, J.B. Nuevos retos para asegurar la calidad de las vacunas. *Bulletin of the World Health Organization*, 2000, 78 (2), 155-62.

FUKUDA, A., UMINO, Y., SAITO, S., HISHIYAMA, M., SUGIURA, A. Improvement in potency assay of measles-mumps-rubella trivalent vaccine: interference between components and measures for its elimination. *Journal of Virological Methods*, 1990, 27, 159-68.

GRUTADAURIA, S., CÓRDOBA, P., CUFFINI, C., ZAPATA, M. Cell-fusion assay for the detection of rubella virus in Vero cells. *Clinical and diagnostic virology*, 1998, 10(1), 9-16.

MCVEY, D., GALVIN, J., OLSON, S. A review of effectiveness of vaccine potency control testing. *Internacional Journal for Parasitology*, 2003, 33, 507-16.

NATES, S., REY, G., GIORDANO, M., ZAPATA, M., DEPETRIS, A., BOSHELL, J. Modified seroneutralization assay for measles virus antibody detection. *Research in Virology*, 1994, 145, 45-49.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Manual de laboratorio para la valoración de vacunas de virus vivos por la técnica de cultivo tisular. Washington, DC, 1981.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Manual de métodos de laboratorio. Para las pruebas de vacunas usadas en el Programa Ampliado de Inmunización. Génova, 1997.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Vacunas e

inmunización. 126ª Sesión del Comité Ejecutivo, Washington, DC, 2000.

RUIZ, J., MERCADO, M., REY, G. 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*, 2005, (40) 4, 284-97.

SCHALK, J., DE VRIES, C., JONGEN, P. Potency estimation of measles, mumps and rubella trivalent vaccines with quantitative PCR infectivity assay. *Biologicals*, 2005, 33, 71-79.

Recibido: 23-01-2007

Aprobado: 30-08-2007