

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
ESCUELA DE GRADUADOS**

“TRABAJO DE TITULACIÓN EXAMEN COMPLEXIVO”  
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAGISTER EN  
MICROBIOLOGÍA

TEMA DE ESTUDIO DE CASO  
“MÉTODO ALTERNATIVO PARA EVALUAR NIVELES DE  
ANTICUERPOS ANTITETÁNICOS EN VACUNAS  
COMBINADAS”

**AUTOR:**

DRA. JENNY MARÍA NAVAS AGUILAR

**TUTOR:**

DR. FRANCISCO MARCELO OBANDO FREIRE PhD.

**AÑO 2016**

**GUAYAQUIL – ECUADOR**



Presidencia  
de la República  
del Ecuador



Plan Nacional  
de Ciencia, Tecnología,  
Innovación y Saberes



**REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**FICHA DE REGISTRO DE TESIS**

**TÍTULO: MÉTODO ALTERNATIVO PARA EVALUAR NIVELES DE ANTICUERPOS ANTITETÁNICOS EN VACUNAS COMBINADAS**

**AUTOR:** DRA. JENNY MARÍA NAVAS AGUILAR

**TUTOR:** DR. FRANCISCO OBANDO FREIRE

**REVISOR:** DRA. ESTHELA TINOCO MORENO

**INSTITUCIÓN:** UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

**FACULTAD:** CIENCIAS MÉDICAS

**CARRERA:** MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA

**FECHA DE PUBLICACIÓN:**

**Nº. DE PÁGS:** 71

**ÁREAS TEMÁTICAS:** MICROBIOLOGÍA – INMUNOLOGÍA

**PALABRAS CLAVES:** Método alternativo, ELISA, anticuerpos antitetánicos.

**RESUMEN** En la actualidad las vacunas combinadas son las que tienen mayor aceptación entre la población, el incremento del número de vacunas en los calendarios de inmunizaciones ha hecho progresar la investigación y el desarrollo en los últimos años. El objetivo del presente estudio, es implementar un método alternativo al ensayo de seroneutralización “*in vivo*”, para evaluar los niveles de anticuerpos antitetánicos en vacunas combinadas. Se utilizó el método cualitativo de estudio de caso, en el cual se describieron las categorías, dimensiones, instrumentos y unidades de análisis, dentro del contexto relacionado a la propuesta del ELISA de tipo indirecto para evaluar los anticuerpos en mezcla de sueros de cobayos a partir de un estándar certificado por el Instituto Finlay de 32 UI /mL. Se analizaron tres lotes de vacunas DT y tres lotes de vacuna Td, por ambos métodos cuyos resultados demostraron tanto en el ensayo “*in vivo*” e “*in vitro*” cumplir con la especificación de  $\geq 2$ UI/mL, además se demostró una buena similitud entre el ELISA y el ensayo biológico. Los niveles de seroprotección (anticuerpos antitetánicos) de las muestras analizadas de vacunas DT y Td en ambos métodos están por encima de 4 UI/mL de antitoxina tetánica, por tanto el método alternativo se considera útil en la evaluación de la respuesta inmune de las vacunas combinadas con el toxoide tetánico de producción nacional.

**Nº DE REGISTRO** (en base de datos):

**Nº DE CLASIFICACIÓN:**

**DIRECCIÓN URL** (tesis en la web)

**ADJUNTO PDF:**

SI

NO

**CONTACTO CON AUTOR/ES:**

Teléfono: 0999078229

E-mail: jennynav25@gmail.com

**CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:**

Nombre: SECRETARIA DE LA ESCUELA DE GRADUADOS

Teléfono: 2288086

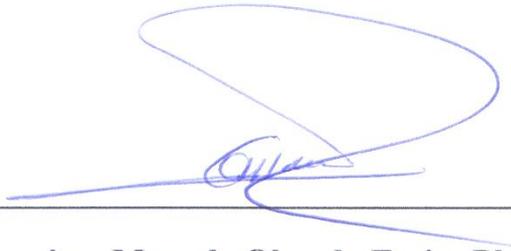
E-mail: egraduadosug@hotmail.com

Av. Whymper E7-37 y Alpillana, edificio Delfos, teléfonos (593-2) 2505660/1; y en la Av. 9 de octubre 624 y Carrión, edificio Promete, teléfonos 2569898/9. Fax: (593 2) 2509054

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En mi calidad de tutor del Programa de Maestría en Microbiología, nombrado por el Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Guayaquil, CERTIFICO: que he analizado las modificaciones y sugerencias realizadas por el revisor, en el estudio de caso, presentado como examen complejo; requisito para optar el grado académico de Magister en Microbiología, titulado “Método alternativo para evaluar niveles de anticuerpos antitetánicos en vacunas combinadas”

**Atentamente**



---

**Dr. Francisco Marcelo Obando Freire PhD.**

**TUTOR**

Guayaquil, 25 de Abril de 2016

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente estudio, con mucho cariño a mi madre, quien con su amor infinito, siempre ha sido, es y será mi impulso en todo anhelo de superación para alcanzar la meta propuesta.

A mis hermanas y sobrinos que son mi estímulo de alegría y perseverancia.

A mis maestros y amigos que siempre me brindaron su apoyo incondicional, motivos más que suficientes para dedicar todo el esfuerzo y entrega en la feliz culminación del presente estudio.

## **AGRADECIMIENTO**

Mi especial agradecimiento a Dios, por existir y ser el motor que impulsa todo en mi vida, a mis padres pilares fundamentales en la formación humana integral.

A mi apreciado Tutor, Dr. Francisco Obando Freire, a mis amigos de cerca y distancia; quienes con sus conocimientos siempre me brindaron su asesoría y apoyo como guías de orientación, para la feliz culminación del presente estudio de investigación; y a la Institución que laboro, por ser parte de mi formación científica.

## DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este estudio de caso, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL”



**Dra. Jenny María Navas Aguilar**

## ABREVIATURAS

**DTP:** Vacuna difteria – tétanos y pertussis

**DTPw:** Vacuna difteria – tétanos y pertussis de pared completa

**DTPa:** Vacuna difteria – tétanos y pertussis acelular

**DT:** Vacuna contra el tétanos y difteria tipo niños

**Td:** Vacuna contra el tétanos y difteria tipo adulto

**TT:** Vacuna contra el tétanos

**ELISA:** Ensayo de inmuno absorción ligado a enzima

**EDTA:** Etilen diamino tetra acético

**Hib:** *Haemophilus influenzae* tipo b

**Lf:** Unidades de floculación

**mL:** Mililitros

**UI:** Unidades Internacionales

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud

**PAI:** Programa Ampliado de Inmunización

**IgG:** Inmunoglobulina G

**RIA:** Radioinmunoensayos

**HA:** Hema-aglutinación

**Anti TT:** Anticuerpos antitetánicos

**ATT:** Antitoxina tetánica

**TMN:** Tétanos materno y neonatal

**ENFARMA E.P:** Empresa Pública de Farmacos

# ÍNDICE DE CONTENIDO

|                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| PORTADA.....                         | i    |
| REPOSITORIO.....                     | ii   |
| CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....         | iii  |
| DEDICATORIA.....                     | iv   |
| AGRADECIMIENTO.....                  | v    |
| DECLARACIÓN EXPRESA.....             | vi   |
| ABREVIATURAS.....                    | vii  |
| ÍNDICE DE CONTENIDO.....             | viii |
| ÍNDICE DE TABLAS.....                | x    |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS.....              | xi   |
| RESUMEN.....                         | xii  |
| ABSTRACT.....                        | xiii |
| 1 INTRODUCCIÓN.....                  | 14   |
| 1.1 Objetivos.....                   | 17   |
| 1.2 Premisa.....                     | 17   |
| 2 DESARROLLO.....                    | 18   |
| 2.1 Marco Teórico.....               | 18   |
| 2.1.1 Vacunas Combinadas.....        | 18   |
| 2.1.2 Anticuerpos Antitetánicos..... | 22   |
| 2.1.3 Referentes Empíricos.....      | 25   |

|       |                          |    |
|-------|--------------------------|----|
| 2.2   | Marco Metodológico ..... | 32 |
| 2.2.1 | Metodología .....        | 32 |
| 2.2.2 | Categorías.....          | 33 |
| 2.2.3 | Dimensiones.....         | 35 |
| 2.2.4 | Instrumentos.....        | 36 |
| 2.2.5 | Unidad de Análisis ..... | 36 |
| 2.2.6 | Gestión de Datos .....   | 38 |
| 2.2.7 | Criterios Éticos.....    | 38 |
| 2.2.8 | Resultados .....         | 39 |
| 2.2.9 | Discusión.....           | 45 |
| 3     | PROPUESTA.....           | 49 |
|       | CONCLUSIONES .....       | 56 |
|       | RECOMENDACIONES .....    | 57 |
|       | BIBLIOGRAFÍA .....       | 58 |
|       | ANEXOS .....             | 62 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| TABLA 1 Prueba <i>in vivo</i> (seroneutralización) vacuna DT.....        | 40 |
| TABLA 2 Concentración media de anticuerpos antitetánicos vacuna DT.....  | 41 |
| TABLA 3 Prueba <i>in vivo</i> (seroneutralización) vacuna Td.....        | 42 |
| TABLA 4 Concentración media de anticuerpos antitetánicos vacuna Td ..... | 43 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| GRÁFICO 1 | Valores del ensayo inmunoenzimático ELISA en vacunas DT..... | 41 |
| GRÁFICO 2 | Comparación ELISA/Seroneutralización vacunas DT .....        | 42 |
| GRÁFICO 3 | Valores del ensayo inmunoenzimático ELISA en vacunas Td..... | 43 |
| GRÁFICO 4 | Comparación ELISA/Seroneutralización vacunas Td.....         | 44 |
| GRÁFICO 5 | Linealidad del ELISA en suero de cobayo con vacuna DT.....   | 44 |
| GRÁFICO 6 | Linealidad del ELISA en suero de cobayo con vacuna Td.....   | 45 |

## RESUMEN

En la actualidad las vacunas combinadas son las que tienen mayor aceptación entre la población, el incremento del número de vacunas en los calendarios de inmunizaciones ha hecho progresar la investigación y el desarrollo en los últimos años. El objetivo del presente estudio, es implementar un método alternativo al ensayo de seroneutralización “*in vivo*”, para evaluar los niveles de anticuerpos antitetánicos en vacunas combinadas. Se utilizó el método cualitativo de estudio de caso, en el cual se describieron las categorías, dimensiones, instrumentos y unidades de análisis, dentro del contexto relacionado a la propuesta del ELISA de tipo indirecto para evaluar los anticuerpos en mezcla de sueros de cobayos a partir de un estándar certificado por el Instituto Finlay de 32 UI /mL. Se analizaron tres lotes de vacunas DT y tres lotes de vacuna Td, por ambos métodos cuyos resultados demostraron tanto en el ensayo “*in vivo*” e “*in vitro*” cumplir con la especificación de  $\geq 2\text{UI/mL}$ , además se demostró una buena similitud entre el ELISA y el ensayo biológico. Los niveles de seroprotección (anticuerpos antitetánicos) de las muestras analizadas de vacunas DT y Td en ambos métodos están por encima de 4 UI/mL de antitoxina tetánica, por tanto el método alternativo se considera útil en la evaluación de la respuesta inmune de las vacunas combinadas con el toxoide tetánico de producción nacional.

**Palabras claves:** Método alternativo, ELISA, anticuerpos antitetánicos

## ABSTRACT

At present vaccines are combined with greater acceptance among the population, the increasing number of vaccines in the immunization schedules has advanced research and development in recent years. The aim of this study is to implement an alternative method to test serum neutralization "in vivo" to assess levels of anti-tetanus antibodies in combination vaccines. the qualitative case study method was used, in which the categories, dimensions, instruments and units of analysis within the context related to the proposal are described. The indirect ELISA was performed to evaluate the antibodies in pooled sera from guinea pigs from a certificate by the Finlay Institute 32 IU / mL standard. Three batches of vaccines DT and three batches of vaccine Td were analyzed by both methods whose results showed both the "in vivo" test and "in vitro" meet specification > 2UI / mL, plus a good similarity was found between ELISA and bioassay. Levels seroprotection (anti-tetanus antibodies) of the samples of vaccines DT and Td both methods are above 4 IU / mL of tetanus antitoxin, so the alternative method is considered useful in assessing the immune response of vaccines combined with tetanus toxoid domestic production.

**Keywords:** Alternative Method, ELISA, anti-tetanus antibodies.

# 1 INTRODUCCIÓN

Las vacunas combinadas presentan mayor grado de aceptación entre la población, debido a que se requiere menos números de dosis inmunizantes para protegerla contra las enfermedades infecciosas, el objetivo de la inmunización además de la prevención es la erradicación de la enfermedad. Las vacunas son eficaces si el microorganismo infeccioso experimenta una variación antigénica escasa o nula, y si no interfiere con la respuesta inmunitaria del huésped. Es difícil vacunar de forma eficaz frente a microorganismos que entran en situación de latencia como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), es muy variable e inactiva componentes fundamentales del sistema inmunitario.

El tétanos es una enfermedad infecciosa conocida desde la antigüedad, provocada por una bacteria *Clostridium tetani*, que crece en condiciones anaerobias como heridas necróticas o en el cordón umbilical si este no se lo mantiene limpio, produce tetanoespasmina, una neurotoxina que bloquea los neurotransmisores inhibidores del sistema nervioso central, provocando rigidez muscular y espasmos característicos del tétanos. La Organización Mundial de la Salud (OMS), informa que a finales de 2014, la vacuna contra el tétanos materno y neonatal (TMN) se había introducido en 103 países y aproximadamente el 83% de los recién nacidos estaban protegidos mediante inmunización. El TMN sigue siendo un problema de salud pública en 24 países, principalmente en países en desarrollo, reflejo de una cobertura insuficiente en programas de inmunización infantil.

La inmunidad al tétanos está mediada por anticuerpos y depende de la cantidad de antitoxinas para neutralizar la tetanoespasmina, sólo puede lograrse mediante inmunización activa (vacuna antitetánica) o pasiva (inmunoglobulina antitetánica específica). Las

vacunas contra el tétanos se basan en el toxoide tetánico, una neurotoxina modificada que induce la formación de antitoxina protectora. La inmunización a las mujeres embarazadas al menos dos semanas antes del parto las protege a ellas y al niño contra el tétanos evitando así TMN.

Los niveles de anticuerpos inducidos por vacunas, pueden ser medidos por métodos “*in vivo*” e “*in vitro*”. Los métodos “*in vivo*”, miden directamente la actividad biológica en animales de laboratorio, son sensibles y específicos, pero caros, variables, requieren personal especializado, mucho tiempo, un gran número de animales y un volumen grande de suero para su ejecución. Los métodos “*in vitro*”, resultan de elección por su sensibilidad y especificidad, permiten determinar anticuerpos en más cantidad de muestras de sueros, en forma rápida y a menor precio.

Estudios realizados en España por Cots y colaboradores; Cuba varios autores Ochoa y Ramírez; Landys y Figueroa; Cira Rodríguez y Goitybell Martínez; Ariel Menéndez y colaboradores en Finlay; Gastón Hernández del Instituto de Salud Pública de Chile y otros de centros especializados en vacunas; demuestran como referentes la utilización de métodos alternativos “*in vitro*”, el que más se menciona ensayo inmunoenzimático (ELISA) para determinar los anticuerpos antitetánicos (IgG antitetánica) en muestras de sueros, con excelentes resultados. En el país no se encontró referencias bibliográficas sobre el uso de métodos “*in vitro*” para la evaluación de anticuerpos antitetánicos como ensayos alternativos a los métodos “*in vivo*”, además conocer la inmunidad contra el tétanos en sueros humanos o animal.

El problema central del presente estudio es el déficit en la ejecución de ensayos biológicos para evaluar los niveles de anticuerpos antitetánicos inducidos por vacunas DT y Td elaboradas por Enfarma, EP, debido a causas que están fuera de control como: elevado número de animales que se utiliza por cada dilución de vacuna, escasez de

patrones de referencia, tiempo prolongado de prueba, falta de alimento para los animales y pocos especialistas traen como consecuencia baja productividad, costos elevados, alto índice de incumplimiento en entrega de certificados de análisis de control de calidad y de hecho clientes internos insatisfechos en el área de producción de los biológicos.

Las limitaciones encontradas en la ejecución de los ensayos “*in vivo*” de potencia para evaluar los niveles de anticuerpos antitetánicos inducidos por vacunas combinadas con toxoide tetánico, llevan a plantear la siguiente pregunta de investigación ¿Cómo contribuir en la evaluación de niveles de anticuerpos antitetánicos inducidos por vacunas combinadas, a través de un método alternativo?

La propuesta de implementar un método alternativo “*in vitro*”, se justifica en la necesidad existente de reducir el empleo del método “*in vivo*” debido al uso y sacrificio de animales de experimentación en ensayos biológicos de rutina, optimizar tiempo, talento humano, disminuir costos en el control de calidad de las vacunas y sobre todo los aspectos éticos vinculados al uso de animales de experimentación, por lo cual es necesario implementar ensayos que sean capaces de reemplazar, refinar y/o reducir el número de animales utilizados en el control de las vacunas. Es importante mencionar que el método alternativo “*in vitro*” ELISA, es una técnica sensible y específica que permite detectar anticuerpos antitetánicos en sueros o plasmas, de manera rápida, sencilla y precisa.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo General**

Implementar un método alternativo para evaluar niveles de anticuerpos antitetánicos en vacunas combinadas elaboradas en producción de biológicos, Enfarma EP.

### **1.1.2 Objetivo Específicos**

- Analizar los referentes teóricos de las vacunas combinadas con toxoide tetánico y los niveles de anticuerpos antitetánicos.
- Estudiar los factores que intervienen en la evaluación de anticuerpos IgG antitetánicos inducidos por vacunas DT y Td, en mezclas de sueros de *Cavia porcellus* (cobayos, curiel o cuy).
- Encontrar los fundamentos necesarios para diseñar la propuesta del método “*in vitro*” ELISA, que permita valorar la respuesta inmune de las vacunas combinadas.

## **1.2 PREMISA**

La premisa del presente estudio es sobre la base de la fundamentación teórica de las vacunas combinadas con toxoide tetánico purificado y el nivel de anticuerpos antitetánicos y analizando los factores de control de calidad biológico y microbiológico, métodos y factores económicos se construye la propuesta de un método alternativo (ELISA) al método “*in vivo*”, que permite evaluar la respuesta inmune de vacunas DT y Td.

## 2. DESARROLLO

### 2.1 MARCO TEÓRICO

#### 2.1.1 VACUNAS COMBINADAS

Las vacunas combinadas son productos farmacéuticos que en una sola dosis contienen antígenos que pertenecen a dos o más microorganismos o parte de ellos; se conocen hace ya 60 años, desde que en 1948 se autorizó la vacuna DPT. La disponibilidad de vacunas combinadas facilita aumentar el número de antígenos en los calendarios de inmunizaciones sistemáticas, con un menor número de inyecciones y una mayor aceptación entre la población, además permite obtener mejores coberturas vacunales (Moraga Llop Fernando A, 2008), (Martinez, 2013).

La Vacunología es una filosofía básica para el desarrollo de vacunas, ha supuesto una de las mayores contribuciones de la inmunología a la medicina, ha tenido que atravesar por varios períodos: El primero de intento y error, el segundo corresponde a las vacunas de sub unidades (antígenos) toxoide tetánico y diftérico, el tercero de las vacunas vivas y cuarto el de ingeniería genética (Madigan M, Martinko J, Parker J., 2004). El nacimiento de la inmunología como ciencia se inició en el momento que el médico inglés Edward Jenner, logró una vacunación satisfactoria contra una enfermedad infecciosa, la viruela humana en 1796. Sin embargo, fue Louis Pasteur, quien a finales del siglo XIX estableció la relación entre gérmenes y enfermedades, realizó grandes avances en inmunoterapia (Arai Y, 1996), (Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, 2008).

En 1884 Koch descubre el *vibrión cólera* y Widal en 1915 sugiere el empleo de vacunación triple asociando al bacilo de Eberth los bacilos paratíficos A y B. En 1923, los

primeros resultados de vacunación antioqueluchosa fueron informados por Madsen; Ramón y Glenny en 1923 descubren la anatoxina o toxoide diftérico; en 1927 Ramón y Zoller la anatoxina o toxoide tetánico; Calmatte y Guerin la BCG. Hay que esperar 1949, con el cultivo de virus sobre células de origen símico o humano por Enders, Weller y Robbins, para tener una profilaxis antiviral. El mecanismo inmunitario de la vacunación se aclaró en 1957 por Frank Macfarlane Burnet, mediante la teoría de la selección clonal y con el posterior descubrimiento del papel de los linfocitos en 1965 (Parslow, 2002), (López M, Mayorquin P., 2004), (Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, 2008).

El tétanos es una enfermedad infecciosa conocida desde la antigüedad, ya se menciona en los escritos de Hipócrates. Es un mal evitable, pero que más letalidad ocasiona en la etapa neonatal (Aguilar R, 1999). Se contrae a través de la exposición a las esporas de la bacteria, *Clostridium tetani*, que existe en todo el mundo en el suelo y en el tracto intestinal de los animales, como tal puede contaminar muchas superficies y sustancias, por esta razón la enfermedad no se puede erradicar. Neurotoxinas producidas por la bacteria bajo condiciones anaeróbicas en las heridas contaminadas con las esporas bacterianas o en el cordón umbilical sino se lo mantiene limpio conducen al tétanos, capaz de causar graves complicaciones, e incluso la muerte (OMS , 2015).

El tétanos es de baja morbilidad y alta mortalidad, causa serios problemas a nivel mundial. La OMS estima en más de 500.000 muertes anuales (MSP, 2013). Tercera causa de muerte entre las enfermedades prevenibles por vacunación en países en vías de desarrollo, únicamente superado por la Hepatitis B y el Sarampión, no así en países desarrollados, donde gracias a la aplicación de programas de vacunación, se ha logrado una tasa de incidencia que fluctúa entre 0.03 a 0.04 casos por 100.000 habitantes.

La vigilancia epidemiología del tétanos en Ecuador, es útil para medir la tendencia de los casos en zonas de mayor incidencia y a futuro generar línea de intervención. La tasa de letalidad está entre el 10% y más del 80% según la edad del paciente y la calidad de atención que se le brinde. El tétanos neonatal se presenta en forma de casos aislados, en el 2012 un caso en Guayaquil área 12. La tasa de letalidad es muy alta y supera el 80 % en los casos con un periodo de incubación breve. El 5% a 20 % de niños que sobreviven presentan graves secuelas entre ellas retraso mental leve (MSP, 2013).

La inmunización previene enfermedades, discapacidades y defunciones por enfermedades prevenibles mediante vacunación, tales como el cáncer cervical, la difteria, la hepatitis B, el sarampión, la parotiditis, la tos ferina, la neumonía, la poliomielitis, las enfermedades diarreicas por rotavirus, la rubéola y el tétanos. En la actualidad, la inmunización evita anualmente entre dos y tres millones de defunciones. Para el 2014, 129 países habían alcanzado por lo menos el 90% de cobertura con la vacuna contra la difteria, el tétanos y la tos ferina (DTP), No obstante, se estima que 18,7 millones de lactantes de todo el mundo aún no reciben las vacunas básicas (OMS, 2015).

Los inmunobiológicos son productos utilizados para inmunizar, incluyen vacunas, toxoides y preparados que contengan anticuerpos de origen humano o animal (PAI, 2006). Según la definición tradicional, vacuna es una sustancia formada por un microorganismo completo, atenuado o muerto, o bien fracciones del mismo, capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera frente al microorganismo virulento. La finalidad de las vacunas es prevenir y controlar futuras infecciones.

Una vacuna es un inmunógeno no patógeno que, al inocularse al huésped, origina inmunidad protectora contra un patógeno específico (Parslow, 2002). Preparado formado por antígenos microbianos, a menudo combinados con adyuvantes, que se administra a las

personas para despertar una inmunidad protectora contra las infecciones microbianas. El antígeno puede estar en forma de microorganismos vivos pero avirulentos, microorganismos muertos, componentes macromoleculares purificados de microorganismo o un plásmido que contenga el ADN complementario encargado de codificar un antígeno microbiano (Abul K. Abbas, 2008).

El toxoide tetánico, se encuentra disponible en el mercado internacional en forma de vacuna monovalente (TT), en vacunas combinadas que contienen además el toxoide diftérico, en dosis normal (DT) o en dosis baja (Td) y las vacunas combinadas contra el tétanos, la difteria y la tosferina (DTwP, DTaP). Además, se comercializa combinaciones que contienen DTwP o DTaP e incluyen antipoliomielítica inactivada, la vacuna contra la hepatitis B y la vacuna contra *H. influenzae* tipo b. Las vacunas se administran mediante una inyección intramuscular o subcutánea, comúnmente en el brazo. Deben conservarse entre 2° C, y 8° C, nunca deben congelarse.

La vacuna DPT es una vacuna “tres en uno” que protege contra la difteria, tosferina y tétanos. Se administra a niños menores de 7 años. La DPTa (acelular) es una versión más segura que la DPTc. (celular), la vacuna DT es una vacuna "dos en uno" que se puede administrar a niños menores de 7 años de edad. No contiene vacuna contra la tosferina, pero contiene vacuna que protege contra la difteria y el tétanos, La vacuna Td es la vacuna "adulta". Es una vacuna "dos en uno" que protege contra el tétanos y la difteria. Contiene una dosis un poco diferente de vacuna contra la difteria que la vacuna DT. Se puede administrar a cualquiera que sea mayor de 7 años de edad.

Según datos proporcionados por el estudio realizado en España por Cots y Colaboradores, con niños de diferentes Servicios de Microbiología, se consideró la cifra de 1 UI/mL de IgG antitetánica como la concentración mínima protectora para la población

pediátrica de esa zona. Dadas la morbilidad y la mortalidad de las infecciones causadas por *Clostridium tetani*, es necesario la vacunación antitetánica en todos los casos en los que sea posible (Cots P. Marin A, Juste C, 1999).

El control de calidad de las vacunas constituye un factor clave para el éxito y la eficacia de los programas de vacunación, además de disponer infraestructura, logística y especialistas altamente capacitados. Por ello la Organización Mundial de la Salud (OMS) y Organización Panamericana de la salud (OPS), les asignan un carácter de prioridad al establecimiento y fortalecimiento de mecanismos que permitan garantizar la utilización de vacunas excelente calidad.

### **2.1.2 ANTICUERPOS ANTITETÁNICOS**

Los anticuerpos son proteínas que reaccionan contra un antígeno (vacunas) en un organismo de tipo humano o animal, se encuentran en fluidos como la sangre, son utilizados por el sistema inmunitario para reconocer y bloquear virus, bacterias, parásitos u hongos (WordPress, 2008). La eficacia de una vacuna depende de factores que intervienen en la respuesta inmunitaria a la vacunación:

- La presencia o ausencia de anticuerpos maternos circulantes
- La naturaleza y la dosis del antígeno administrado
- El modo de administración de la vacuna
- La utilización o no de un coadyuvante

Los anticuerpos inducidos por vacunas o presentes en la población, pueden ser medidos por métodos “*in vivo*” e “*in vitro*”. Los métodos “*in vivo*”, miden directamente la actividad biológica en animales de laboratorio, son sensibles y específicos, pero caros, requieren personal altamente entrenado, mucho tiempo, un gran número de animales y un

volumen relativamente grande de suero para su ejecución (Ochoa R. F., 2012). Estos bioensayos miden la respuesta de anticuerpos usando un modelo animal. Los ensayos de neutralización se basan en la propiedad neutralizante de los anticuerpos séricos sobre dosis conocidas de antígeno, como es el caso de la toxina tetánica, la cual, al quedar libre, se detecta en animales de laboratorio, generalmente ratones o cobayos (Ramirez J, Fajardo E, 2005), (Ochoa R. , Bases metodológicas para evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas, 2008), (OMS, 2013).

Los métodos “*in vitro*”, detectan no sólo anticuerpos funcionales, sino también pueden revelar reacciones entre otros sistemas antígeno-anticuerpo, por lo que deben ser interpretados cuidadosamente y correlacionados con los métodos “*in vivo*” cuando estén disponibles, o evaluar su respuesta en estudios clínicos de eficacia vacunal. Las reacciones de antígenos y anticuerpos son muy específicas. Un antígeno reacciona sólo con un anticuerpo inducido por los antígenos de su misma clase o por un antígeno muy semejante. Debido a esta gran especificidad, las reacciones entre un antígeno y un anticuerpo pueden usarse para identificar a uno por medio del otro, esta especificidad es la base de las reacciones serológicas (Jawez, Melnick, 2002), (Ochoa R. , Bases metodológicas para evaluación de anticuerpos, ensayos clínicos de vacunas, 2008), (OMS, 2013).

Se han descrito numerosos métodos “*in vitro*” no funcionales, para la determinación de los niveles de anticuerpos antitetánicos presentes en sueros o plasmas, tales como hemaglutinación pasiva (HA) y radioinmunoensayos (RIA) y ELISAs. Los inmunoensayos enzimáticos, El ELISA (del inglés Enzyme-Linked- Immunosorbent Assay), análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas, resulta la técnica de elección entre los ensayos *in vitro* no funcionales, por su sensibilidad y especificidad son semejantes al RIA y puede procesar

un número pequeño o grande de muestras (Madigan M, Martinko J, Parker J., 2004), (Abbas A, Lichtman A, 2008),

El principio de ensayo indirecto se basa en que los anticuerpos en la muestra reaccionan y forman un complejo con los antígenos adsorbidos a la fase sólida, y son detectados por un conjugado similar al descrito en el RIA, a excepción de que en este caso el isótopo radioactivo es sustituido por una enzima. La cantidad de enzima enlazada indica la cantidad de anticuerpos en el suero y puede ser medida por la degradación de su sustrato. Cuando la concentración de anticuerpos es baja, los resultados del ELISA indirecto correlacionan poco con los ensayos *in vivo*, ya que tiende a sobrestimar los sueros de bajos títulos, probablemente se debe a la presencia de inmunoglobulinas inespecíficas o anticuerpos de baja afinidad. (Ochoa R. , Bases metodológicas para evaluación de anticuerpos, ensayos clínicos de vacunas, 2008), (Cira Virgen Rodríguez, 2013).

Otra alternativa han sido los ensayos de inhibición de antígeno, se basan en la detección del antígeno no enlazado por anticuerpos específicos adsorbidos en la fase sólida. El fundamento teórico de estas pruebas se basa en que la unión entre el anticuerpo y el antígeno se favorece cuando éste está en solución; sin embargo, estos ELISAs son más complicados, sobre todo cuando se requiere procesar un gran número de muestras. Los ensayos de doble antígeno, al igual que los indirectos, emplean antígenos de captura vacunales, pero en lugar de un conjugado anti-inmunoglobulina-enzima, usa antígeno-enzima, de esta forma se alcanza la máxima sensibilidad y detectabilidad al no ser necesario diluir las muestras; sin embargo, detecta todas las clases de inmunoglobulinas, lo que en ocasiones no es deseable, (Rolando, 2004) , (Abbas A, Lichtman A, 2008).

Para medir anticuerpos, los antígenos conocidos se fijan a una fase sólida (placas de plástico para microdilución), se incuban con diluciones del suero en estudio, se lava y se reincuba con una antiinmunoglobulina marcada con una enzima (por ejemplo, la peroxidasa de rábano). La actividad de la enzima, medida con la adición del sustrato específico y el desarrollo de una reacción de color, es una función directa de la cantidad de anticuerpo enlazado (Brooks G, Harley J, Klein D, 2004). Los ensayos que usan como marcador enzimas (inmunoensayos enzimáticos) presentan extraordinarias ventajas aún no superadas, tales como:

- Elevada sensibilidad, detectabilidad y especificidad.
- Equipamiento relativamente barato.
- Procedimientos técnicos rápidos y sencillos.
- Alta precisión y exactitud.
- Reactivos de bajo costo y larga vida.
- Gran variedad de sustratos y cromógenos

(Abbas A, Lichtman A, 2008), (Ochoa R. F., 2012)

Estos ensayos se apoyan en tres características biológicas fundamentales:

- La extraordinaria especificidad de los anticuerpos.
- El elevado poder catalítico.
- La alta especificidad de las enzimas.

### **2.1.3 REFERENTES EMPÍRICOS**

Varios estudios realizados en España, Cuba, Chile; demuestran que los métodos inmunoenzimáticos, tipo (ELISA), utilizados para determinar anticuerpos antitetánicos (IgG antitetánica) en sueros humanos o de animales, son de alta sensibilidad y precisión.

En los bancos de sangre de Cuba se cuantifica antitoxina tetánica, a partir del suero de donantes inmunizados, para producir una gammaglobulina humana específica. Se emplea un ensayo inmunoenzimático heterogéneo de tipo indirecto, que utiliza el suero como muestra analítica. Se seleccionó por muestreo aleatorio simple, 100 donantes de plasma que acudieron a donar entre octubre y noviembre del 2013. Para la obtención de suero se realizó una extracción de 5 mL de sangre por punción venosa, depositada en tubo de ensayo de cristal seco. La muestra de 1,5 mL de plasma se obtuvo al final de la donación, colectada en un tubo plástico con tapa. Se utilizó el programa estadístico informático SPSS para Windows. Los valores de antitoxina tetánica en suero fueron mayores que los del plasma. La media de las diferencias entre ambos grupos resultó estadísticamente significativa,  $p=0,00$ .

Generalmente el suero es la muestra de elección para el diagnóstico serológico de enfermedades infecciosas. Este puede ser esencial para ciertas técnicas inmunológicas como: fijación de complemento o pruebas de aglutinación; sin embargo, para otras pruebas: hemaglutinación, ELISA o inmunoblot, pueden utilizarse suero o plasma. Algunos juegos de reactivos que emplean métodos inmunoenzimáticos para cuantificar anticuerpos de la clase IgG antitoxina tetánica, incluyen el empleo de plasma heparinizado o con EDTA, como muestra alternativa al suero (Ariel Menéndez Barrios, Plasma como muestra alternativa para cuantificar antitoxina tetánica, 2015).

La Universidad de Ciencias Médicas de La Habana y el Centro Nacional de Genética Médica, realizaron un estudio de estandarización y validación de un ensayo de inmuno absorción ligado a enzima (ELISA) de tipo indirecto para cuantificar antitoxina tetánica en suero humano, útil para la evaluación de la respuesta inmune humoral frente a antígenos vacunales.

El estándar preparado para la curva del ensayo se calibró frente al preparado en el Instituto Finlay. Se normalizaron los indicadores óptimos para el desarrollo de cada paso de la técnica. Durante la validación se alcanzó una buena precisión intraensayo e interensayo en todos los casos. Al evaluar el paralelismo el coeficiente de variación fue menor de 10%. El ensayo mostró una excelente exactitud, con valores de recuperación entre 90% y 110%. El límite de detección fue 0.002 UI/mL. La sensibilidad analítica alcanzada fue de 0.01 UI/mL. Con los resultados obtenidos se llega a la conclusión, que el ensayo puede ser utilizado para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano (Cira Virgen Rodríguez, 2013).

En el estudio realizado por Landys y colaboradores en Cuba, para la evaluación del componente tetánico TT en vacunas combinadas se siguió un esquema de dos inmunizaciones (0 y 28 días), con desangrado a los 42 días. Los ratones fueron desangrados por vía retroorbital y el suero se obtuvo por el mismo procedimiento descrito para Hib. La evaluación de los títulos anti-TT se realizó por un ELISA desarrollado en el laboratorio. Las placas fueron incubadas toda la noche a 4 °C con TT a 0.5 s.f. /M<sup>a</sup> en 100 Mohs/L de tampón carbonato / bicarbonato (pH 9,6). El resto de los pasos del ELISA fueron muy similares al descrito para determinar la actividad biológica del componente PRP (Hib), sólo que utilizando un suero hiperinmune antitetánico y conjugado anti-ratón. El criterio de aceptación utilizado fue el siguiente: actividad antitetánica en los sueros  $\geq 2$  UI de Antitoxina tetánica/mL.

En el estudio se muestra el comportamiento de los títulos anti-PRP y anticuerpos antitetánicos anti-TT y de la potencia in vivo / in vitro del componente HB en vacunas combinadas en comparación con vacunas que contienen un solo antígeno. En el caso de la actividad biológica del componente Hib, se obtuvieron incrementos estadísticamente significativos en las vacunas que contenían PRP y wP de forma simultánea en comparación

con la vacuna Hib monovalente, no ocurriendo así en otras combinaciones como la de HB+Hib (Landys Mario, Figueroa J, Lara A, Perdon Vicente, 2008).

Algo similar ocurrió con los títulos de anticuerpos anti-TT, los cuales tuvieron un incremento en vacunas combinadas cuya formulación incluía TT y Pertussis celular en relación con la vacuna antitetánica, sólo que no en todos los casos este aumento fue significativo. Por ejemplo, la vacuna DPT tuvo un incremento aproximadamente el doble de vacuna TT, pero este no fue estadísticamente significativo, a diferencia de las que contenían Difteria, Tétanos y Pertussis completa junto al componente HB o Hib, cuyos títulos si mostraron diferencias significativas en relación con la vacuna monovalente.

El propósito del estudio denominado “Interacción del componente pertussis de células completas con antígenos tetánico, *Haemophilus influenzae* tipo B y Hepatitis B en ensayos de potencia para vacunas combinadas”, fue evaluar la interferencia potencial del componente pertussis de células completas sobre los ensayos para determinar la actividad biológica de otros antígenos como toxoide tetánico, *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) y hepatitis B (Landys Mario, Figueroa J, Lara A, Perdon Vicente, 2008).

El Instituto de Salud Pública de Chile, en sus investigaciones demuestran que los métodos inmunoenzimáticos (ELISA), utilizados para detectar y cuantificar anticuerpos antitetánicos (IgG antitetánica) en sueros humanos o de animales, son de alta sensibilidad y precisión. La eficacia de la vacuna es casi 100% luego de la tercera dosis, sin embargo el título disminuye con el tiempo por lo que se sugiere un refuerzo cada 10 años, considerando 0.01 UI/mL el título protector mínimo de anticuerpos antitetánicos (Gonzalez P, Hernández, Rivero B, 2006).

El objetivo del estudio “detección y cuantificación de anticuerpos anti-tétanos en sueros equinos mediante ELISA” fue cuantificar anticuerpos antitetánicos en sueros equinos, para lo cual se utilizaron placas de ELISA sensibilizadas con toxoide tetánico como antígeno de captura. En cada placa se realizó una curva de calibración (2, 5, 10, 20, 50, 100 y 150 UI/mL) con suero equino de referencia del Instituto de Salud Pública (ISP) de Chile. El método utilizado permite discriminar entre sueros equinos con títulos de anticuerpos altos y bajos y ha permitido evaluar la respuesta en el tiempo de los equinos inmunizados con vacuna antitetánica ISP (Gonzalez P, Hernández, Rivero B, 2006).

El Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de la Habana, Cuba, publicó un estudio realizado por Juan Carlos Ramírez y Colaboradores, este trabajo pretende introducir un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) como método alternativo a la prueba de seroneutralización in vivo utilizada en la evaluación de la potencia de las vacunas antitetánicas. Se desarrolló un ELISA de tipo indirecto para cuantificar antitoxina tetánica en suero de cobayo, a partir de un estándar 29 UI/mL previamente calibrado. Se determinó la precisión, exactitud y linealidad del ensayo. Se analizó la correlación entre el ELISA y la prueba biológica mediante la evaluación de un total de 75 muestras de sueros por ambos métodos.

El ensayo demostró ser preciso y exacto, con imprecisiones inferiores al 20% y valores de recuperación entre el 90–110%. Las desviaciones del paralelismo mostraron coeficientes de variación alrededor del 10%. El análisis por regresión lineal mostró una buena correlación entre el ELISA y el ensayo biológico ( $R^2= 0.989$ ). El método alternativo desarrollado probó ser una herramienta útil para determinar potencia de vacunas antitetánicas a partir de la evaluación independiente de la respuesta de cada animal contra toxoide tetánico. Los niveles de seroprotección se encontraron entre 83–100% (Ramirez J, Fajardo E, 2005).

El estudio realizado por Rolando Ochoa y Colaboradores en el Instituto Finlay. Ciudad de La Habana - Cuba, desarrollaron un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) de tipo indirecto para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano, como un procedimiento alternativo a los métodos in vivo que permita conocer la inmunidad contra el tétanos y evaluar la respuesta al componente tetánico en vacunas combinadas que se desarrollan en ese país. La mayor respuesta se alcanzó a los dos años de edad, al completar el esquema básico de inmunización. Todos los niños presentaron valores superiores al nivel mínimo protector de 0.01 UI/mL (Rolando Ochoa, Martínez J. Fajardo E, 2000).

El estudio de estandarización y validación de un ELISA para la determinación de niveles séricos de anticuerpos antitetánicos, con antígeno local (toxóide tetánico del Instituto de Salud Pública de Chile), abre la posibilidad de disponer de una metodología rápida, en el momento oportuno. Así mismo realizar estudios epidemiológicos a gran escala que se pueden enfocar en diversos grupos etarios, de forma tal que se adquiere información local de la población vacunada y la protección real de población chilena al tétanos (Instituto Salud Pública Chile, 2000)

El patrón secundario de referencia se tituló frente al patrón primario internacional NIBSC, resultando un valor de 4.6 UI/mL- Tanto el patrón primario de referencia, como el patrón secundario mostraron linealidad apropiada con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 97.75% y 97.49%, respectivamente. El valor de P en el análisis de varianza es menor 0.01, lo que demuestra una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración al 99% del nivel de confianza. El valor de P para falta de ajuste en la tabla ANOVA es mayor o igual a 0.10, lo que determina que el modelo seleccionado para el estudio de los datos, es adecuado. Las muestras tienen un valor P en el análisis de varianza mayor o igual a 0.05, por cuanto no hay diferencias significativas de las medias entre un

día y otro, al 95% del nivel de confianza. El coeficiente de variación de las muestras fue 13.28% y 11.79%, respectivamente.

Según los resultados obtenidos en la medición de los parámetros: linealidad, precisión, exactitud y límite de detección, se concluye que el Método ELISA para determinar anticuerpos antitetánicos en sueros humanos es capaz de diferenciar entre diferentes títulos con la precisión adecuada; la técnica puede ser utilizada en el apoyo diagnóstico primaria en niños, medición de título para verificar protección post vacunación contra tétanos (Instituto Salud Pública Chile, 2000).

En el país no se encontró referencias bibliográficas sobre métodos “*in vitro*”, para la determinación cuantitativa de anticuerpos antitetánicos como ensayos alternativos a los métodos “*in vivo*”, que permita conocer la inmunidad contra el tétanos sea en sueros humanos o animal. El propósito de este estudio al igual que los referidos por varios autores de países como Chile, Cuba, España y Brasil, es proporcionar una visión general del estado de la ciencia al introducir y desarrollar alternativas 3Rs, para la evaluación de las vacunas combinadas, así como en los proyectos de investigación que incluyen métodos “*in vitro*” (ELISA, cultivo celular, ensayos bioquímicos, inmunológicos y funcionales).

Las tres Rs se refieren a Reemplazar los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, Reducir su número cuando sea necesario utilizarlos, y Refinar las técnicas para aminorar su sufrimiento, adoptadas en “Declaración de Montreal sobre la síntesis de la evidencia para avanzar los principios 3Rs en la ciencia” (Marlies Leenaars, Merel Ritsk - Hoitinga , Gilly Griffin y Elisabeth Ormandy, 2011).

## 2.2 MARCO METODOLÓGICO

### 2.2.1. METODOLOGÍA

Para alcanzar el objetivo propuesto en el presente estudio, se realizó una investigación cualitativa, porque se utilizó y recolectó datos e información científica sobre diversos aspectos o componentes del fenómeno a investigar en un momento dado y su explicación. El proceso de indagación cualitativa es flexible y se mueven entre los eventos y su interpretación, entre las respuestas y el desarrollo de la teoría (Hernández R, Fernández C, Baptista P, 2013). La metodología cualitativa se basa en la utilización del lenguaje verbal y tiene por objeto de estudio el comportamiento en su ámbito natural, y se propone descubrir el significado del comportamiento más que su cuantificación (Uv.Es., 2015). Describe cualidades de un fenómeno, busca un concepto que pueda abarcar una parte de la realidad, no se trata de probar o medir en qué grado se encuentra esta cualidad de un estudio determinado, sino de descubrir tantos aspectos sea posible (Barrios, 2013).

El Método del presente estudio de investigación es un estudio de caso, el cual se basó en recopilación bibliográfica de estudios de expertos y otros materiales documentales, descripción y análisis de la situación en conjunto, y dentro de su contexto relacionado con la propuesta de un método alternativo para evaluar los niveles de anticuerpos antitetánicos, en vacunas combinadas que contienen además toxoide diftérico (DT o dT) y en vacunas que combinan otros antígenos como las células completas inactivadas de *Bordetella pertussis* (DPT); recientemente el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B y el poliribosil ribitol fosfato (PRP) del *Haemophilus influenzae* tipo b, combinado con DPT conformaron la vacuna pentavalente (DPT-HB-Hib) (Exposito, 2006).

Una vez que se revisó la literatura científica, afinó el planteamiento del problema (ver anexo 2) y se insertó en el campo de la investigación, se recolectó los datos de diversos estudios realizados en varios países donde ya se están implementando los métodos alternativos “*in vitro*”, para la determinación de los niveles de anticuerpos antitetánicos (antitoxina tetánica) presentes en sueros o plasmas que fueron inducidos con vacunas combinadas contra el tétanos. Entre los métodos alternativos mejor descritos para detectar los anticuerpos antitetánicos son el ELISA y el ToBi, con los cuales se han logrado excelentes resultados y una correlación significativa con los ensayos de neutralización de toxina *in vivo* (Ramirez, Juan Carlos, Fajardo Esther, 2005).

**Tabla C D I U**

| Categoría                 | Dimensiones  | Instrumentos   | Unidades de Análisis                        |
|---------------------------|--|--|---|
| <b>Control de Calidad</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vacuna DT</li> <li>• Vacuna Td</li> <li>• Niveles de anticuerpos en mezclas de sueros de cobayos</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i>: Sero neutralización (UI/mL)</li> <li>• <i>In vitro</i>: ELISA (UI/mL)</li> <li>• Concentración</li> <li>• Diluciones</li> </ul> | Control Interno de Calidad                  |
| <b>Método</b>             | <p><i>In vivo</i></p> <p><i>In vitro</i></p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sero neutralización (UI/mL)</li> <li>• ELISA (UI/mL)</li> </ul>   | Control Interno de Calidad                  |
| <b>Financiera</b>         | Presupuesto  | Análisis documental de la certificación presupuestaria   | Gestión presupuestaria asignada y devengada |

**Elaborado por: Autora**

### 2.2.2 CATEGORÍAS

Para efecto del desarrollo de este estudio de investigación se analizaron las categorías de control de calidad, método y financiera, con respecto a la propuesta del

proyecto de implementar un método alternativo para evaluar los niveles de anticuerpos antitetánicos presentes en sueros de curieles que fueron inducidos con vacunas combinadas contra el tétanos, se describe a continuación las siguientes consideraciones ([ver anexo 3](#)).

De acuerdo con los objetivos descritos, esta propuesta de investigación consideró la categoría de Control de Calidad, factor importante para el éxito y la eficacia de los programas de vacunación de vacunas DT y Td, además de disponer de infraestructura, logística, personal especializado y todos los recursos apropiados (equipos, patrones de referencia, procedimientos), es la utilización de vacunas seguras y eficaces que hayan pasado un buen control de calidad. La inmunización de una vacuna con una inocuidad desconocida y baja potencia pone en peligro los esfuerzos y recursos invertidos para lograr una alta cobertura de vacunación. Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS), mantiene con firmeza la cobertura vacunal mundial y la proporción de niños de todo el mundo que reciben las vacunas recomendadas se ha mantenido estable en los últimos años (OMS, 2015).

La categoría de método que se utilizó para evaluar la calidad de los productos biológicos, merece una consideración especial ya que resultan complejos, la utilización de los métodos “*in vivo*”, tienen sus limitaciones, una alta variabilidad, sus costos, duración y sobre todo los aspectos éticos vinculados al empleo de animales para experimentación, investigación y docencia, en concordancia con los artículos 46 y 47 de la “Ley Orgánica de Bienestar Animal” y cumpliendo con los protocolos internacionales de bienestar animal establecidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), (Asamblea Nacional, 2014).

En las últimas décadas, varios autores han descrito algunos métodos “*in vitro*”, para la determinación de los niveles de anticuerpos antitetánicos presente en sueros o plasmas, tales como hemaglutinación pasiva (HA), radioinmunoensayos (RIA) y ensayo inmunoenzimático indirecto ELISA, resultando esta técnica de elección entre los ensayos “*in vitro*”. Es una técnica muy sensible y específica que permite la cuantificación de anticuerpos antitetánicos en una gran cantidad de muestras de suero, de forma rápida y con bajos costos; además los resultados obtenidos por los ELISAs demuestran una buena correlación con aquellos derivados de los ensayos biológicos, (OMS, 2001), (Ochoa R. , Bases metodológicas para evaluación de anticuerpos, ensayos clínicos de vacunas, 2008), para ello se utilizaron como herramientas de medición el análisis documental e instrumental en la Unidad de Control de Calidad.

En este estudio se consideró también la categoría financiera, para que sea factible implementar el método alternativo de evaluación de los niveles de anticuerpos antitetánicos en vacunas combinadas. Se requiere la asignación de una partida presupuestaria certificada por la Unidad de Gestión, además lo que se va a invertir en compra de equipos, reactivos materiales e insumos, servirá para optimizar tiempo, recursos, desarrollar y actualizar los conocimientos científicos y tecnológicos al mismo nivel que se lo hace en otros países desarrollados.

### **2.2.3 DIMENSIONES**

Los componentes del presente estudio son las vacunas combinadas: DT y Td; toxoide tetánico purificado; niveles de antitoxina tetánica (anticuerpos antitetánicos); ensayo “*in vivo*”; ensayo “*in vitro*” y presupuesto asignado para la ejecución del mismo.

#### **2.2.4 INSTRUMENTOS**

Se utilizaron como herramientas de medición el análisis documental e instrumental en la Unidad de Control de Calidad. Para el análisis de los datos cualitativos se recolectó información científica y bibliográfica de varios estudios y artículos realizados en Cuba, Brasil, Chile, los cuales tienen relación con la propuesta de implementar un método alternativo en la evaluación de anticuerpos antitetánicos en las vacunas combinadas con toxoide tetánico; para tabular los datos se utilizó como herramienta programas computacionales en Microsoft Office que sirvieron para el análisis de la información y posterior conclusión de los resultados obtenidos.

#### **2.2.5 UNIDAD DE ANÁLISIS**

Las categorías estudiadas en el presente estudio de caso, se realizaron en varias unidades analíticas, las categorías de Control de Calidad y Métodos se realizaron en la Unidad de Control Interno de Calidad; finalmente la categoría Financiera se realizó en la Unidad de Gestión Presupuestaria, donde se asigna el presupuesto para diligenciar los procesos de compras en las unidades operativas.

Las muestras de vacunas combinadas con toxoide tetánico purificado posterior al muestreo, se almacenaron entre 2°C-8°C y procesaron en el laboratorio de Control Interno, luego se procede a la inmunización de cobayos, después del intervalo de tiempo de 4 y 6 semanas se desangra por punción cardíaca a los animales sujetos de estudio; luego se obtiene una mezcla de sueros de cobayos, el cual se dispensa en viales de 5 mL y almacena a - 20° C hasta la ejecución del ensayo inmunoenzimático (ELISA). El método utiliza estándares internacionales o patrones nacionales calibrados contra un estándar de la OMS, y los materiales y reactivos que se utilice cumple las especificaciones de calidad.

El estudio se realizó en el Sub proceso de Control Interno del Instituto Nacional de Higiene “Leopoldo Izquieta Pérez”, localizado en las calles Julián Coronel 905 entre José Mascote y Esmeraldas, de la Parroquia Tarqui. Su ubicación geográfica es al Noroeste del Cantón Guayaquil, Provincia del Guayas y sus límites son: Norte: Calle Julián Coronel; Sur: Ciudadela Orellana; Este: Calle José Mascote y Oeste: Ciudadela Bolivariana.

El Ecuador, a través del Instituto Nacional de Higiene, tiene una rica tradición en la producción de vacunas. Su historia se remonta al año 1945 cuando se inició la producción de Vacuna Pertussis y Toxoide Diftérico, con lo que se empezó a elaborar la vacuna doble de Pertussis-Difteria. En el año 1966 viajó a capacitarse la profesional que se hizo cargo de la producción de Toxoide Tetánico, y es así que en 1969 se elaboró el primer lote de vacuna DPT, el cual fue sometido al control referencial internacional OPS/OMS con muy buenos resultados.

A partir de los años 80, se establecieron estrategias de vacunación contra el tétanos a todas las embarazadas. En 1989 se inició el plan de erradicación identificando áreas y vigilancia para identificar casos de tétanos neonatal (TNN) y no neonatal. En 1999 y el 2000 se realizaron campañas nacionales de vacunación con dT a las mujeres en edad fértil. (MSP, 2015). El impacto de estas campañas de prevención se evidenció al disminuir la tasa de TTN a 0.02 por 1000 nacidos vivos en el año 2000, observándose una tendencia horizontal entre el 2000 y 2005.

Las áreas en riesgo de TTN están distribuidas en todo el país, no observándose una región específica. Los informes del país señalan que las 24 provincias del país, cinco provincias tienen cobertura acumulada de 10 años de 90% y más, diez tienen entre 50 y 89 % y siete provincias tiene entre menos del 50 % (MSP 2015).

### **2.2.6 GESTIÓN DE DATOS**

Para el procesamiento de la información se llevó un registro de datos primarios, se los clasificó, almacenó y validó en programas computarizados Excel de Microsoft, después se procede a la tabulación y correspondiente análisis mediante el empleo de estadística descriptiva, donde se va a resumir los datos y resaltar patrones de interés en la investigación. Finalmente los datos se presentan mediante tablas y gráficos para mayor comprensión del estudio.

Con los resultados de la investigación, se realizó un análisis de la actividad de anticuerpos de las muestras en estudio, con un programa de cálculo CDC- ELISA, los cuales serán presentados en tablas de contingencia de 2x2 y gráficos estadísticos elaborados en software estándares.

### **2.2.7 CRITERIOS ÉTICOS**

Es necesario resaltar que más allá de una respuesta al cuestionamiento ético, los argumentos a favor de los avances de los ensayos “*in vitro*”, ya sean de orden funcional o económico, tiene sustento. Es así que el presente estudio de investigación, se apoya en la autonomía que tienen las universidades y escuelas politécnicas de fomentar la investigación; y se fundamentó en aspectos legales de la “Ley Orgánica de Bienestar Animal”, enunciado en el Art. 46 del capítulo VII, de los animales para experimentación, investigación y docencia, con respecto a la Bioética en la investigación y experimentación en animales, cumpliendo con los protocolos internacionales de bienestar animal establecidos por la OIE y la Declaración de Montreal (Asamblea Nacional, 2014), (Marlies Leenaars, Merel Ritsk - Hoitinga , Gilly Griffin y Elisabeth Ormandy, 2011).

El presente estudio de caso se realizó en la Unidad de Control de Calidad del Instituto Nacional de Higiene Leopoldo Izquieta Pérez, hoy Empresa Pública de Fármacos (Enfarma, EP), el cual fue aprobado por la Coordinación Técnica del Proceso Producción de Biológicos, Enfarma EP – Guayaquil y no presenta conflictos de interés.

## **2.2.8 RESULTADOS**

El control de calidad de las vacunas combinadas, constituye un factor importante para el éxito y la eficacia del Programa Nacional de Inmunización, además la infraestructura, logística y talento humano capacitado, son herramientas importantes para utilizar vacunas con calidad y de fácil acceso a la población. La OMS y OPS, asignan un carácter de prioridad al establecimiento y fortalecimiento de mecanismos que permitan a los países garantizar la utilización de vacunas de buena calidad.

Las metodologías analíticas tradicionales que se utilizan para evaluar la calidad de las vacunas combinadas resultan complejas, lo que provoca un verdadero desafío a los productores, obligándolos a generar innovación y nuevas tecnologías para obtener productos cada vez más sofisticados y desarrollar nuevos métodos de control, o mejorar los existentes, para que sean capaces de determinar con exactitud y veracidad las características de las vacunas combinadas en estudio y conforme a las especificaciones técnicas de los biológicos.

La propuesta de un método alternativo, se establece con la finalidad de diseñar y aplicar un método “*in vitro*”, para evaluar los niveles de anticuerpos antitetánicos en vacunas combinadas con toxoide tetánico, a fin de reducir prácticas “*in vivo*”, las cuales involucra el uso de animales de experimentación en ensayos de rutina. Es importante mencionar que entre los métodos “*in vitro*”, el ELISA ha demostrado ser una técnica útil por su alta sensibilidad, permite obtener de manera rápida y con alta precisión excelentes

resultados, los cuales se correlacionan con el tradicional método “*in vivo*”. Los beneficiarios serán los animales porque no serán sacrificados frecuentemente y además los biológicos utilizados por la comunidad tendrán resultados oportunos, precisos y confiables.

Las muestras de vacunas DT y Td, se procesaron en el Laboratorio de Control Interno de Calidad del Instituto Nacional de Higiene, “Leopoldo Izquieta Pérez” de Guayaquil, actualmente Enfarma EP, con apoyo del personal profesional que en el labora. Se realizó la inmunización de las vacunas DT y Td, sangrías por punción cardíaca de los animales, obtención de la mezcla de sueros de cobayos, ensayo de neutralización “*in vivo*” y ensayo inmunoenzimático “*in vitro*” para titulación de los anticuerpos antitetánicos.

En el presente estudio las muestras seleccionadas fueron de vacunas combinadas con toxoide tetánico purificado de producción nacional, DT (niños) y Td (adultos), se analizaron tres lotes de cada vacuna antitetánica y los resultados encontrados en la investigación, se organizaron en tablas y gráficos mediante el programa Excel 2010, se tabularon y analizaron utilizando estadística descriptiva y para detectar la actividad de anticuerpos mediante el ensayo “*in vitro*” se utilizó el programa de cálculo CDC-ELISA. A continuación se muestran tablas y gráficos con los resultados obtenidos en el laboratorio.

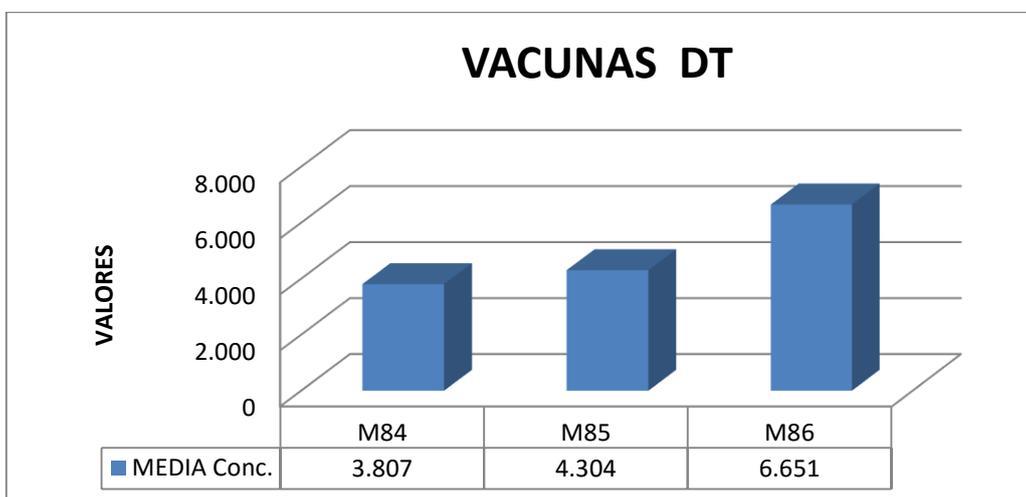
| <b>Tabla 1. Prueba in vivo (seroneutralización) vacuna DT</b>       |                             |                         |
|---|-----------------------------|-------------------------|
| <b>Lotes (Mn)</b>   | <b>Fecha de elaboración</b> | <b>Potencia (UI/mL)</b> |
| 84  | 05/01/2010                  | 4                       |
| 85  | 05/01/2010                  | 4                       |
| 86  | 02/03/2010                  | >4                      |
| <b>Fuente:</b> Archivos del Instituto Nacional de Higiene-Guayaquil |                             |                         |

En la presente tabla se evidencian los resultados del ensayo de seroneutralización en vacunas mixtas niños DT Lotes Mn: 84, 85 y 86, donde se obtuvieron 4UI/mL, 4 UI/mL y >4UI/mL respectivamente.

| Tabla 2. Concentración media de anticuerpos antitetánicos vacunas DT |          |                             |
|--|----------|-----------------------------|
| Lotes (Mn)   | Dilución | Media Concentración (UI/mL) |
| 84   | 800      | 3.494                       |
|  | 1600     | 3.593                       |
|  | 3200     | 4.335                       |
|  |          | <b>X= 3.807</b>             |
| 85   | 800      | 4.025                       |
|  | 1600     | 4.051                       |
|  | 3200     | 4.835                       |
|  |          | <b>X= 4.304</b>             |
| 86   | 800      | 6.534                       |
|  | 1600     | 6.329                       |
|  | 3200     | 7.091                       |
|  |          | <b>X=6.651</b>              |

**Fuente:** Autora

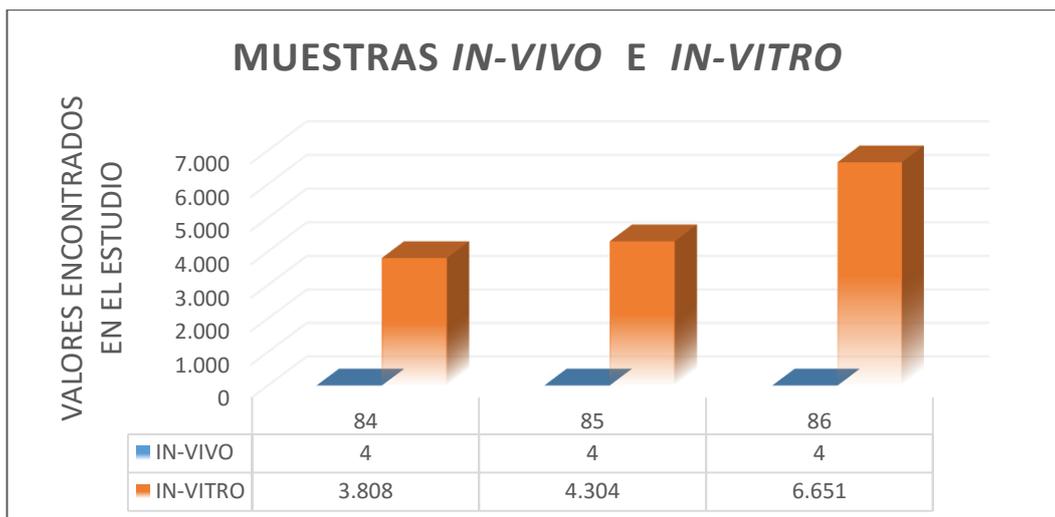
Se denominan a las muestras DT aquellas que son de vacuna mixta niños, en las mismas se evidencian 3 muestras Lotes Mn: 84, 85 y 86; las diluciones de los sueros de las tres muestras respectivamente y las concentraciones medias encontradas de anticuerpos antitetánicos por cada dilución (Tabla 2)



**Gráfico 1. Valores del ensayo inmunoenzimático ELISA en vacunas DT**

**Fuente:** Autora.

El presente gráfico muestra los resultados “*in vitro*” de ELISA en las vacunas DT Lotes Mn: 84, 85 y 86, donde se obtuvieron 3.807; 4.304 y 6.651UI/mL respectivamente.



**Gráfico 2. Comparación ELISA / Seroneutralización en vacunas DT**

**Fuente:** Autora.

Se puede apreciar en el gráfico anterior la comparación entre el ELISA “*in vitro*” y el ensayo de seroneutralización “*in vivo*”, con los valores encontrados de concentración media de anticuerpos antitetánicos en las vacunas DT Lotes Mn: 84, 85 y 86.

**Tabla 3. Prueba in vivo (seroneutralización) vacuna Td**

| Lotes (Ma) | Fecha de elaboración | Potencia(UI/mL) |
|------------|----------------------|-----------------|
| 75         | 17/12/2010           | >2 - <4         |
| 77         | 17/12/2010           | 4               |
| 82         | 28/04/2011           | >4              |

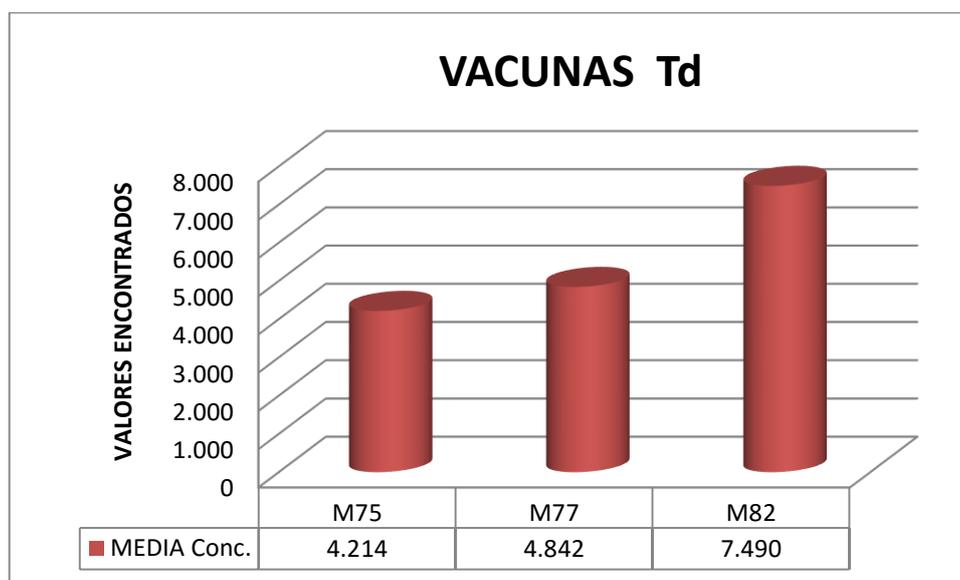
**Fuente:** Archivos del Instituto Nacional de Higiene - Guayaquil

En la tabla 3 se evidencian los resultados del ensayo de seroneutralización en vacunas mixtas adultos Td Lotes Ma: 75, 77 y 82, donde se obtuvieron >2UI/mL y <4UI/mL; 4UI/mL y >4UI/mL respectivamente.

| Tabla 4. Concentración media de anticuerpos antitetánicos vacunas Td |          |                             |
|--|----------|-----------------------------|
| Lotes (Ma)   | Dilución | Media Concentración (UI/mL) |
| 75   | 800      | 3.831                       |
|  | 1600     | 4.166                       |
|  | 3200     | 4.646                       |
|  |          | <b>X= 4.214</b>             |
| 77   | 800      | 4.566                       |
|  | 1600     | 4.719                       |
|  | 3200     | 5.241                       |
|  |          | <b>X= 4.842</b>             |
| 82   | 800      | 8.044                       |
|  | 1600     | 6.725                       |
|  | 3200     | 7.701                       |
|  |          | <b>X= 7.490</b>             |

**Fuente:** Autora.

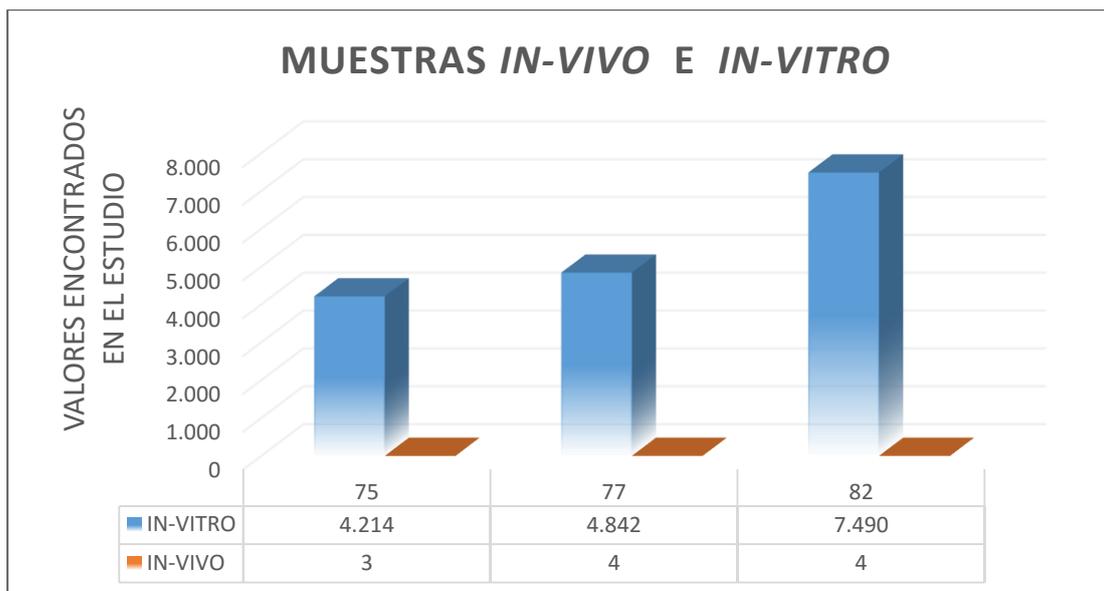
Se denominan a las muestras Td aquellas que corresponden a la vacuna mixta adultos, en la tabla se evidencian 3 muestras de Lotes Ma: 75, 77 y 82, sus correspondientes diluciones y las concentraciones medias encontradas de anticuerpos antitetánicos.



**Gráfico 3. Valores del ensayo inmunoenzimático ELISA en vacunas Td**

**Fuente:** Autora.

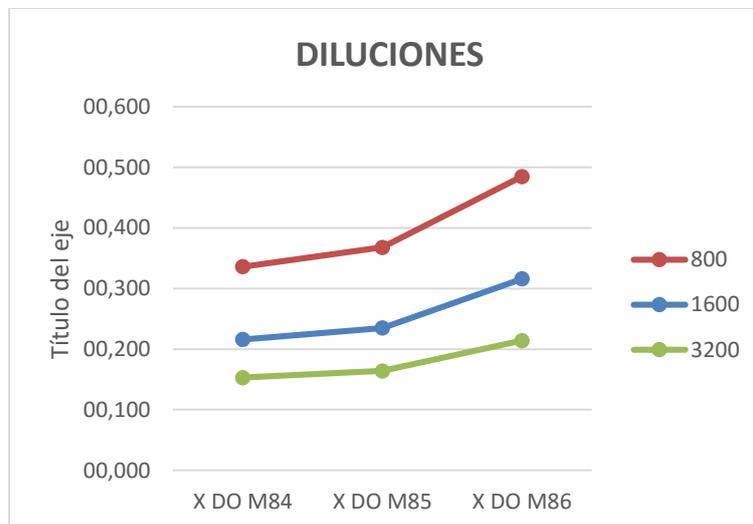
En el presente gráfico se evidencian los resultados “*in vitro*” de ELISA para vacunas mixtas adultos Td Lotes Ma: 75, 77 y 82 respectivamente, donde se obtuvieron valores de 4.214; 4.842 y de 7.490 UI/mL respectivamente.



**Gráfico 4. Comparación ELISA / Seroneutralización en vacunas Td**

**Fuente:** Autora.

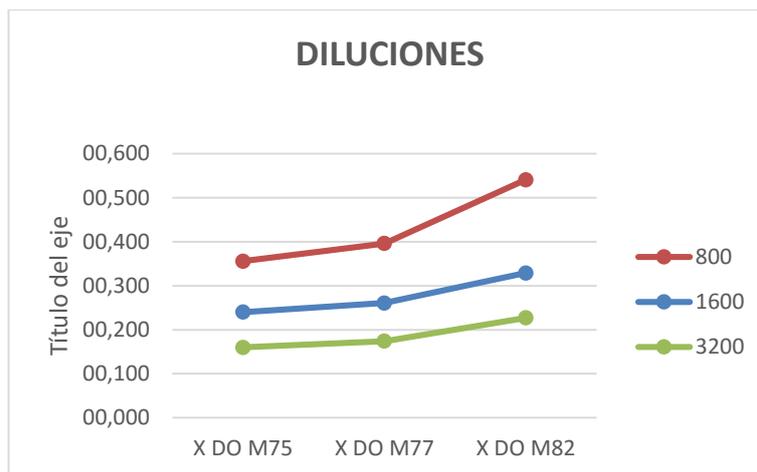
Se puede apreciar en el gráfico anterior, la comparación entre el ELISA “*in vitro*” y el ensayo de seroneutralización “*in vivo*”, con los valores encontrados de concentración media de anticuerpos antitetánicos en las vacunas Td Lotes Mn: 75, 77 y 82.



**Gráfico 5. Linealidad del ELISA en suero de cobayo con Vacuna DT**

**Fuente:** Autora

Se observa en el presente gráfico las diluciones de las muestras de vacuna DT, desde 1/800 hasta 1/3200.



**Gráfico 6. Linealidad del ELISA en suero de cobayo con Vacuna Td**

**Fuente:** Autora

Se evidencia en el gráfico anterior las diluciones de las muestras de vacuna Td, desde 1/800 hasta 1/3200.

## 2.2.9 DISCUSIÓN

Los títulos de anticuerpos en sueros humanos o animales, inducidos por las vacunas combinadas con toxoide tetánico purificado, pueden ser medidos por métodos “*in vivo*” e “*in vitro*”, el método tradicional aceptado por los organismos regulatorios internacionales y nacionales es el ensayo de seroneutralización “*in vivo*”; mide directamente la actividad biológica en animales de laboratorio. A pesar de ser un método sensible resulta complicado, costoso, requieren gran cantidad de animales y mayor volumen de suero para su ejecución.

Los inconvenientes que ocasiona los métodos “*in vivo*”, lleva a evaluar los niveles de antitoxina tetánica presente en suero o plasma utilizados en ensayos de inmunidad contra tétanos. Varios autores en las últimas décadas describen los métodos “*in vitro*”, como una alternativa para determinar la respuesta inmune de las vacunas combinadas con toxoide tetánico purificado. El ensayo inmunoenzimático tipo ELISA, ha demostrado ser la técnica de elección entre los ensayos “*in vitro*” no funcionales, su sensibilidad y

detectabilidad son semejantes al radioinmunoensayo (Ariel Menéndez Barrios, Plasma como muestra alternativa para cuantificar antitoxina tetánica, 2015).

Los materiales de referencia (MRT) utilizados para el ensayo “*in vitro*”, fueron certificados por el Instituto Finlay, El suero de antitoxina tetánica de cobayo de referencia con un valor de 32 UI / mL, para la curva de calibración; suero antitoxina tetánica de cobayo de referencia, para el control positivo. Se utilizó suero de cobayo, control negativo y toxoide tetánico purificado estéril de procedencia nacional.

Se analizó los sueros de cobayos de tres lotes de vacunas DT y tres lotes de vacunas Td, por ambos métodos cuyos resultados se aprecia en la tabla 1, demostraron tanto en el ensayo “*in vivo*” e “*in vitro*” según se observa en la tabla 3, cumplen la especificación de  $>2\text{UI/mL}$ , además el ELISA demostró buena concordancia con el ensayo de seroneutralización. Los resultados obtenidos son similares a los encontrados por Landys y Colaboradores, quienes desarrollaron un ELISA como método alternativo a pruebas biológicas existentes, con una actividad antitetánica en los sueros  $\geq 2\text{ UI /mL}$  de antitoxina tetánica. (Landys Mario, Figueroa J, Lara A, Perdon Vicente, 2008), por tanto el método alternativo propuesto se considera útil en la evaluación de la respuesta inmune de las vacunas combinadas con el toxoide tetánico. Los niveles de seroprotección (anticuerpos antitetánicos) encontrados en el ensayo “*in vivo*” para las vacunas DT están en 4 UI/mL y las vacunas Td por encima de 2UI/mL.

Los resultados de concentración media obtenidos por cada dilución de las vacunas DT según tabla 2 y vacunas Td de acuerdo a la tabla 4, demuestran que el método “*in vitro*” tiene valores más acertados, dado que no son número enteros como los que se

registran “*in vivo*”; en donde no existen los decimales únicamente números cerrados. Por este motivo los resultados alcanzados “*in vitro*”, son mejores dado que proporcionan cifras más reales y específicas lo cual evidencia una buena calidad de la vacuna, se corresponden como los alcanzados en los estudios (Ramirez J, Fajardo E, 2005), (Cira Virgen Rodríguez, 2013).

Los valores del ensayo inmunoenzimático ELISA en vacunas DT Lotes Mn: 84, 85 y 86, de 3.807; 4.304 y 6.651 respectivamente, como se puede apreciar en el gráfico 2 se corresponden con los alcanzados por otros autores que han desarrollado y correlacionado métodos de ELISA similares para determinar anticuerpos antitetánicos en sueros humanos, cobayo o ratón, quienes demostraron que el ELISA indirecto desarrollado reproduce los resultados obtenidos por el ensayo biológico con la media de los valores séricos de  $\geq$  2UI/mL y 9.022 UI/mL de antitoxina tetánica /mL (Landys Mario, Figueroa J, Lara A, Perdono Vicente, 2008) , (Ariel Menéndez Barrios, Plasma como muestra alternativa para cuantificar antitoxina tetánica, 2015).

Para el ensayo “*in vitro*” se evaluaron concentraciones entre 2 Lf/mL y 12 Lf/mL. Se escogió 2 Lf/mL como concentración óptima de recubrimiento del antígeno (toxóide tetánico), porque alcanzó un valor de absorbancia máximo que no aumenta con la concentración del antígeno hasta 12 Lf/mL. Los valores de absorbancia del suero control negativo (CN) y blanco fueron inferiores al punto más diluido de la curva de calibración en todas las concentraciones que se analizó, resultados parecidos se encontró en estudios de otros autores referente a validación del método de ELISA estudios (Ramirez J, Fajardo E, 2005), (Cira Virgen Rodríguez, 2013).

Los resultados alcanzados en el ensayo “*in vitro*” tiene un coeficiente de determinación de  $R^2 = 0.9989$ , el cual es superior a  $\geq 0.98$ , que lo hace valido al igual que el ensayo “*in vivo*” realizado, el parámetro de linealidad del ELISA para las vacunas DT y vacunas Td tienen resultados muy parecidos a los encontrados por Ramírez y colaboradores con un buen coeficiente de correlación  $R^2 = 0.989$ , el coeficiente de variación en todas las muestras estudiadas tienen  $< 20\%$ , que se evidencian en los estudios realizados en Chile, Brasil, Cuba (Ramírez J, Fajardo E, 2005) (Ariel Menéndez Barrios, Plasma como muestra alternativa para cuantificar antitoxina tetánica, 2015).

Las limitaciones encontradas en el presente estudio de caso, es la poca disponibilidad de patrones de referencia certificados, para evaluar el nivel de anticuerpos antitetánicos inducidos por vacunas combinadas, pocos proveedores nacionales y los productos importados tienen muchas exigencias regulatorias nacionales, que aumentan costos y pérdida de tiempo. En la actualidad ya existen kits comerciales de ultra micro-ELISA (UMELISA), que se usan con igual calidad y son las nuevas tendencias en las diversas líneas de investigación en países desarrollados, para realizar control de calidad de biológicos de uso humano y animal.

## 3 PROPUESTA

**Título:** Método alternativo tipo ELISA indirecto

Esta propuesta se establece con la finalidad de diseñar y planificar un método alternativo “*in vitro*” que permita evaluar los niveles de anticuerpos antitetánicos en vacunas combinadas a fin de reducir la práctica “*in vivo*” la cual involucra el uso de animales.

### **Antecedentes**

Como antecedente al planteamiento de este trabajo de investigación, se indica que no existen propuestas con el tema: “Propuesta de método alternativo para evaluar niveles de anticuerpos antitetánicos en vacunas combinadas” el desarrollo del presente estudio, se ha elaborado basándose en la información recolectada en el Sub Proceso de Control Interno del Instituto Nacional de Higiene, “Leopoldo Izquieta Pérez” y del Proceso de Producción de Biológicos, Enfarma EP, de la ciudad de Guayaquil.

### **Justificación**

La elaboración de este trabajo investigativo, se justifica en la necesidad existente de reducir el empleo del método “*in vivo*” debido al uso y sufrimiento de animales en ensayos biológicos. Es importante mencionar que el método “*in vitro*” permite obtener de manera rápida y precisa excelentes resultados, los cuales son parecidos con el método “*in vivo*”.

### **Beneficiarios**

- **Los animales.-** Porque no serán utilizados y sacrificados frecuentemente.
- **La comunidad científica.-** Debido a que estarán en una condición de dar resultados más acertados, con alto nivel de precisión.
- **La población.-** Al tener mayor acceso a vacunas de calidad podrán acceder a mejores respuestas inmunitarias y prevenirse de enfermedades infecciosas.

## **Objetivos de la propuesta**

### **Objetivo General**

Elaborar una guía práctica del método alternativo “*in vitro*” tipo ELISA indirecto, para evaluar niveles de anticuerpos antitetánicos en vacunas combinadas elaboradas en Enfarma

### **Objetivos Específicos**

- Racionalizar el uso y sacrificio de animales de experimentación utilizados en las pruebas de control biológico de las vacunas combinadas.
- Establecer la comparación entre el ensayo ELISA y el ensayo de seroneutralización, en cuanto a la detección serológica de los niveles de anticuerpos antitetánicos.
- Disminuir los recursos económicos a la empresa del Estado Enfarma E.P, al demostrar la validez del método “*in vitro*” en el control de calidad de las vacunas.
- Mejorar el control de las enfermedades infecciosas, a través de la prevención con vacunas oportunas y disponibles en menor tiempo en los centros de salud del país.

### **Importancia de la propuesta**

La importancia de esta propuesta, se debe a la gran cantidad de animales que requieren los ensayos “*in vivo*”, los costos de producción y control de calidad de vacunas se incrementan, por ello los modelos “*in vitro*” se están implementando en diversos países como demuestran estudios realizados en España, Brasil, Chile, Cuba, donde se evalúan la respuesta inmune inducida en humanos o animales inmunizados con toxoide tetánico dando buenos resultados; por tanto Ecuador también necesita implementar esta metodología de evaluación de niveles de anticuerpos antitetánicos en el control biológico de las vacunas para disminuir o reemplazar el empleo de animales de experimentación, ser más oportunos y eficientes en la liberación de mayor cantidad de lotes de vacunas.

Si se hace realidad el proyecto propuesto se podrá establecer una correlación entre los ensayos de neutralización “*in vivo*” con los ensayos “*in vitro*”, lo cual permitirá sustituir un método por otro alternativo, ahorrar tiempo y recursos en la Producción y Control Interno de vacunas DT, Td, elaboradas en el Proceso de Producción de Biológicos, Enfarma E.P.

### **Descripción de la propuesta**

- **Inmunización y sangrías.**

1. Inocular 0.5 mL de vacunas DT ó Td, vía subcutánea a 6 cobayos de 450 a 500 gramos de peso, igual sexo e igual número de lote.
2. Proceder a realizar a las 4 semanas la primera sangría vía cardiaca, de 5 ml / animal.
3. Realizar a las 6 semanas la segunda sangría vía cardiaca, de 5 ml / animal.

- **Separación del suero de la sangre.**

1. Incubar a 37°C durante dos horas las muestras de sangre total, que corresponden a primera y segunda sangría, para obtener la máxima cantidad de suero.
2. Centrifugar las muestras de sangre total a 2000 rpm durante 30 minutos.
3. Transferir el suero con una micropipeta a nuevos tubos y realizar una segunda centrifugada si aún se observa presencia de células sanguíneas.
4. Hacer una mezcla de sueros luego de la segunda centrifugada.
5. Colocar las muestras de sueros en baño de agua a 56°C por 30 minutos para su completa inactivación.
6. Almacenar en frascos de 5 mL las muestras a -20° C ó -55 ° C, hasta proceder a ejecutar las pruebas “*in vitro*”.

- **Titulación de anticuerpos antitetánicos mediante ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) de tipo indirecto.**

1. Sensibilizar placas ELISA con 100 uL por pocillo de toxoide tetánico a una concentración de 2 Lf/mL en solución amortiguadora carbonato-bicarbonato de sodio 0.05 M pH 9.6.
2. Incubar la placa durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda.
3. Eliminar el toxoide no absorbido lavando la placa 4 veces con 300 uL por pocillo de solución de lavado, Tween 20 al 0.05% en agua destilada.
4. Elaborar la curva de calibración a partir de 5 diluciones dobles seriadas, desde 1/400 hasta 1/64000, del suero antitetánico estándar obtenido en cobayos.
5. Preparar la dilución de trabajo para las muestras de sueros de 1/800 hasta 1/3200 según la dosis recibida de toxoide, en solución buffer de fosfatos pH 7,4 (PBS) con leche descremada al 3% (p/v).
6. Adicionar 100 uL por pocillo de las muestras y del estándar por duplicado.
7. Incubar la placa a 37°C durante una hora en cámara húmeda.
8. Lavar como se indicó anteriormente, agregar 100 uL del conjugado por pocillo anti-IgG de cobayo/fosfatasa, a dilución 1:15000, en PBS-leche descremada 3%(p/v).
9. Incubar nuevamente la placa a 37°C durante una 1 hora y después lavar.
10. Añadir 100 uL por pocillo del sustrato para nitrofenil fosfato a 1mg/mL en solución de dietanolamina 0.92 M, pH 9,8.
11. Incubar las placas durante 30 minutos a 20-25°C en la oscuridad, y detener la reacción con 50uL por pocillo de hidróxido de sodio 2N.
12. Medir las absorbancias en un lector de placas ELISA a 405 nm.
13. Recopilar los datos al finalizar el tiempo de estudio y evaluar los resultados obtenidos.

## Factibilidad Económica

En las siguientes tablas se detallan los recursos de laboratorio, valores y costos que se ven involucrados al momento de realizar el ensayo “*in vitro*”, para evaluar la respuesta inmune frente las vacunas combinadas DT y Td:

### Equipos, instrumentos y materiales de laboratorio

| Nombre  | Marca e identificación   |
|---|--|
| Esterilizador a vapor (Autoclave)                               | <b>Marca:</b> Sakura<br><b>Modelo:</b> YLC 009SWZ<br><b>Serie:</b> 98015586  |
| Esterilizador en seco (Horno)                                   | <b>Marca:</b> MLW<br><b>Modelo:</b> WST 5010   |
| Vitrina refrigerada   | <b>Marca:</b> Indurama.<br><b>Serie:</b> 512057670948  |
| Centrifuga refrigerada  | <b>Marca:</b> Eppendorf<br><b>Modelo:</b> 5804- R.<br><b>Serie:</b> 0031298  |
| Balanza analítica   | <b>Marca:</b> Mettler Toledo<br><b>Modelo:</b> AG204<br><b>Serie:</b> 1125061511<br><b>rango pesada:</b> 0.1 mg - 210g |
| Sistema de purificación de agua destilada.                      | <b>Marca:</b> Sakura.<br><b>Modelo:</b> PSW – 12<br><b>Serie:</b> 98015587   |
| Incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$         | <b>Marca:</b> Thermoscientific<br><b>Modelo:</b> Estándar  |
| Medidor de pH   | <b>Marca:</b> Mettler Toledo   |
| Congelador a $-20^{\circ}\text{C}$ .                            | <b>Marca:</b> Sanyo<br><b>Modelo:</b> MDF0442<br><b>Serie:</b> 80100335  |
| Agitador de tubos.  | <b>Marca:</b> Thermolyne Maxic Mix Plus<br><b>Modelo:</b> M63215<br><b>Serie:</b> 1271020212122                        |
| Agitador magnético  | <b>Marca:</b> Fisher   |
| Cabina de Flujo Laminar.  | <b>Marca:</b> Dalton<br><b>Modelo:</b> BGB 1300<br><b>Serie:</b> 202229802.  |
| Lavador de placas   | <b>Marca:</b> Rayto  |
| Lector de ELISA   | <b>Marca:</b> Rayto<br><b>Modelo:</b> RT – 2100 C  |
| Pipeta multicanal de 50-300 uL                                  | <b>Eppendorf</b>   |
| Pipetas automáticas de volumen variable 20 uL, 100 uL y 1000 uL | <b>Eppendorf</b>   |
|   |  |

| <b>COSTOS DE PRUEBA “IN VITRO” (ELISA)</b>       |                                      |                            |               |
|--|--------------------------------------|----------------------------|---------------|
| <b>VACUNAS COMBINADAS: DPT, DT, Td.</b>          |                                      |                            |               |
| <b>Sustancias Químicas</b>                       | <b>Precio/Presentación<br/>Marca</b> | <b>Cantidad<br/>(g/mL)</b> | <b>Costos</b> |
| Cloruro de Sodio p.a.                            | \$/ 30.50/ 1000g Merck               | 16 g                       | \$ 0.488      |
| Cloruro de Potasio p.a                           | \$ 95/500g Merck                     | 0.4 g                      | \$ 0.076      |
| Carbonato de Sodio p.a                           | \$/ 135/ 500g Merck                  | 1.59 g                     | \$ 0.429      |
| Hidrógeno carbonato de sódio p.a                 | \$ 20/100 g Merck                    | 2.93 g                     | \$ 0.586      |
| Ázida sódica p.a                                 | \$ 52/100 g Merck                    | 10 g                       | \$ 5.20       |
| Hidrógeno fosfato disódico anhidro p.a           | \$ 61/500 g Merck                    | 2.3 g                      | \$ 0.28       |
| Di Hidrógeno fosfato de potasio monobásico p.a   | \$ 30/500g Merck                     | 0.4 g                      | \$ 0.024      |
| Cloruro de magnésio anhidro p.a                  | \$ 25/500g Merck                     | 0.2 g                      | \$ 0.01       |
| Acido clorhídrico p.a                            | \$ 30/Litro Merck                    | 26 mL                      | \$ 0.78       |
| Dietanol amina p.a                               | \$ 95/Litro Merck                    | 97 mL                      | \$ 9.215      |
| Tween 20 p.a                                     | \$ 120/Litro Merck                   | 1.5 mL                     | \$ 0.18       |
| Leche descremada                                 | \$ 50/ 500g Difco                    | 3 g                        | \$ 0.30       |
| BSA (Fracción V)                                 | \$ 1970 /500 Sigma                   | 1 g                        | \$ 1.90       |
| Hidróxido de sódio p.a                           | \$ 36 /1000g Merck                   | 40 g                       | \$ 1.44       |
| TRIS-hidroximetil-aminometano clorhidrato p.a    | \$ 420/1000g Merck                   | 0.788 g                    | \$ 0.330      |
| Conjugado anti-IgG de cobayos fosfatasa alcalina | \$ 542 /mL Sigma                     | 0.2 mL                     | \$ 108.4      |
| Sustrato p-nitrofenil fosfato en tabletas de 5mg | \$ 275/ 5 tab. Sigma                 | 0.025 g                    | \$ 55.00      |
| Agua para inyección                              | \$ 0.6/Litro                         | 12000 mL                   | \$ 7.20       |
| <b>Animales de experimentación</b>               | <b>Precio/ Proveedor</b>             | <b>Cantidad<br/>(u)</b>    | <b>Costos</b> |
| Cobayos  | \$ 8.45 INSPI                        | 6 u                        | \$ 50.70      |

| <b>Materiales de consumo</b>  | <b>Precio/Presentación</b>           | <b>Cantidad (u)</b>    | <b>Costos</b>    |
|---|--------------------------------------|------------------------|------------------|
| Papel de empaque  | \$0.40 / unidad                      | 6 u                    | \$ 2.40          |
| Piolas de algodón   | \$2.60 (unidad/380m)                 | ¼                      | \$ 0.65          |
| Gasa Sencilla   | \$ 52 (100 yardas)                   | 5 yardas               | \$ 2.60          |
| Algodón hidrófilo   | \$5.87 (1 Libra)                     | ¼ libra                | \$ 1.46          |
| Controles de Horno  | \$91 ( 100/caja)                     | 6 u                    | \$ 5.46          |
| Control de Autoclave  | \$78. (100/caja)                     | 6 u                    | \$ 4.68          |
| Cinta adhesiva  | \$ 2.76 c/u                          | 1 u                    | \$ 2.76          |
| Jeringuilla de 3mL  | \$ 0.13 c/u                          | 20 u                   | \$ 2.60          |
| Jeringuilla de 20mL   | \$ 0.39 c/u                          | 6u                     | \$ 2.34          |
| Guantes látex no estéril  | \$ 0.57/par                          | 10 pares               | \$ 5.70          |
| Guantes Talla 7-7 1/2   | \$ 25.20 (50 pares)                  | 5 pares                | \$ 2.75          |
| Puntas para pipetas de 1000uL   | \$ 27/1000 u                         | 100 u                  | \$ 2.70          |
| Puntas para pipetas 20-200 uL   | \$ 20/50 u                           | 25 u                   | \$10.00          |
| Placas para microtitulación de 96 pocillos, de poliestireno rígido, fondo plano | \$ 50/Kit 10 u                       | 3 u                    | \$15.00          |
| Alimento balanceado de cobayos  | \$ 24.55/40 Kg                       | 40 Kg                  | \$ 24.55         |
| <b>Desinfectantes</b>   | <b>Precio/Presentación<br/>Marca</b> | <b>Cantidad (g/mL)</b> | <b>Costos</b>    |
| Alcohol potable   | \$ 1.28 (1 Litro)                    | 105 mL                 | \$0.13           |
| Fenol p.a   | \$ 323 (1 Kg ) Merck                 | 0.25 g                 | \$0.08           |
| <b>TOTAL DE COSTOS:</b>   |                                      |                        | <b>\$ 328.39</b> |
| <b>Tiempo de análisis:</b> 24 horas   | <b>Personal involucrado:</b>         |                        |                  |
|   | 1 Profesional                        |                        | 24 horas         |
|   | 2 Auxiliares                         |                        | 24 horas         |

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## CONCLUSIONES

El presente estudio de caso cumple con los objetivos planteados en la propuesta, la implementación de un ELISA indirecto como método alternativo al ensayo de seroneutralización “*in vivo*”, para detectar niveles de anticuerpos antitetánicos inducidos por vacunas combinadas DT y Td. Se analizaron los aspectos relacionados de vacunas combinadas con toxoide tetánico y el nivel de anticuerpos, encontrándose en la evaluación serológica “*in vivo*” la presencia de anticuerpos antitetánicos que fueron inducidos mediante inmunización de vacunas DT, Td, además la prueba *in vivo* de seroneutralización pasó el ensayo.

Se identificaron los factores cualitativos que influyen en la determinación de anticuerpos IgG antitetánicos, los cuales indican que el método “*in vitro*” ELISA desarrollado es rentable por sus bajos costos, rapidez de ejecución y confiabilidad de resultados, por tanto al implementarse en la Unidad Analítica de Control Interno de Calidad, se va a solucionar parte de los problemas encontrados en el control biológico, al cumplirse con la entrega oportuna y eficaz de las vacunas en los centros de salud del país.

El método alternativo por su alta sensibilidad, fácil manejo y automatización se considera útil, en la valoración de la respuesta inmune en humanos y animales inducidos por vacunas combinadas; el cual desde el punto de vista financiero es factible desarrollarlo en un futuro. Los niveles de seroprotección contra el tétanos encontrados en el estudio están por encima de 4UI/mL, tanto en el ensayo “*in vivo*” e “*in vitro*”, existe buena similitud en ambos métodos, los resultados cumplen con el valor de especificación técnica del producto  $\geq 2$  UI/mL; lo cual demuestra mayor veracidad y confiabilidad en la respuesta que podría esperarse en los humanos inmunizados con vacunas combinadas DT, Td.

## RECOMENDACIONES

El incremento del número de vacunas en los calendarios de inmunizaciones en los últimos años, ha hecho progresar la investigación y el desarrollo de vacunas combinadas, por ello se recomienda continuar haciendo estudios relacionados al control de calidad de los biológicos.

- Utilizar métodos alternativos sensibles y específicos, que permitan evaluar la respuesta inmune inducida por vacunas combinadas, sin embargo es necesario correlacionar con los ensayos “*in vivo*” ya existentes y aprobados por los comités de expertos nacionales e internacionales en estandarización y control de biológicos de la OMS y OPS.
- Emplear ensayos inmunoenzimáticos de tipo indirecto, en el cual los anticuerpos antitoxina tetánica de la clase IgG, presentes en la muestra, se fijan al antígeno vacunal, toxoide tetánico que revisten las placas de ELISA o Ultra-micro ELISA (UMELISA TETANOS), diseñado para el uso en suero humano como muestra analítica y de mucha utilidad en los bancos de sangre.
- Implementar y socializar la propuesta del método alternativo *in vitro*, con la finalidad de que los especialistas dispongan de una herramienta útil en el control de calidad de las vacunas, mejorar el control de las enfermedades inmunoprevenibles y así beneficiar a la población con vacunas oportunas y de excelente calidad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Dr. Miguel Tregnaghi , Dra. Ana Cevallos . (2005). En *Manual de Vacunas de Latinoamerica* (págs. 7-9). Córdoba : SLIPE.
- Abbas A, Lichtman A. (2002). *Inmunología celular y molecular*. Madrid: McGraw-Hill.
- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. (2008). *Inmunología celular y molecular* 6a Edición. España: Gea Consultoria Editorial, S.L.L.
- Aguilar R, M. R. (febrero de 1999). *Tendencias de morbilidad, mortalidad y letalidad por tétanos*. Obtenido de <http://www.fihudiagnostico.org.pe/revista>.
- Arai Y, Arita I, Arita M, Chino F, Kataoka T, Kataoka T. (1996). *Vaccine Handbook*: Researchers Associates National Institute of Health. Tokyo, Japan: Borrada.
- Ariel Menéndez Barrios, P. S.-C. (2015). Plasma como muestra alternativa para cuantificar antitoxina tetánica. *VacciMonitor*, 52-56.
- Ariel Menéndez Barrios, P. S.-C. (2015). Plasma como muestra alternativa para cuantificar antitoxina tetánica. *VacciMonitor*, 52-56.
- Asamblea Nacional. (28 de Octubre de 2014). *Ley Orgánica de Bienestar Animal*. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Barrios, A. (2013). *Metodología de la Investigación 3*. Guayaquil: Rijabal S.A.
- Brooks G, Harley J, Klein D. (2004). *Microbiología Médica*. En *Microbiología Médica* (págs. 763-773). Pearson Educación S.A.
- Cira Virgen Rodríguez, G. M. (2013). Estandarización y Validación de un ELISA para cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 534-541.
- Cots P. Marin A, Juste C. (1999). Reacciones Adversas a toxoide tetánico. *Alergología Inmunología Clínica*, 73-78.

- Exposito, N. (2006). Desarrollo de vacuna pentavalente.
- Garcés. (2000). En *Investigación científica* (págs. 70-76). Quito: Abya Yala.
- Gonzalez P, Hernández, Rivero B. (29 de 01 de 2006). *Detección y cuantificación de anticuerpos antitetánicos en sueros equinos*. Obtenido de sitio web ptgonzalispch.ch.
- Hernández R, Fernández C, Baptista P. (2013). Metodología de la investigación. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Inmunizaciones*. (17 de 10 de 2005). Obtenido de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/article>.
- Instituto Salud Pública Chile. (24 al 26 de Octubre de 2000). *Estandarización y validación de un ELISA para determinar niveles séricos de anticuerpos antitetánicos*. Obtenido de [www.ispch.cl/encabezado/noticias/doc/TetanoPoster1.doc](http://www.ispch.cl/encabezado/noticias/doc/TetanoPoster1.doc)
- Jawez, Melnick. (2002). *Microbiología Médica*. México: Manual Moderno.
- Landys Mario, Figueroa J, Lara A, Perdon Vicente. (2008). Interacción del componente pertussis de células completas con los antígenos tetánico. *VacciMonitor*, 7-13.
- López M, Mayorquin P. (Septiembre de 2004). *Vacunas de nueva generación, Informe de Vigilancia epidemiológica*. Obtenido de [http://www2.uned.es/091279/ingenieria\\_genetica/PDFs/vacunas.pdf](http://www2.uned.es/091279/ingenieria_genetica/PDFs/vacunas.pdf).
- Madigan M, Martinko J, Parker J. (2004). *Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson.
- Marlies Leenaars, Merel Ritsk - Hoitinga , Gilly Griffin y Elisabeth Ormandy. (25 de Agosto de 2011). *Alternativas y uso de animales en las ciencias de la vida: Declaración de Montreal*. Obtenido de [http://www.altex.ch/resources/035038\\_GriffinL41.pdf](http://www.altex.ch/resources/035038_GriffinL41.pdf)

Martinez, D. D. (18 de 01 de 2013).

[http://www.teinteresa.es/blogs/pregunta\\_al\\_medico/epidemiologia/vacunas-combinadas\\_0\\_849516891.html](http://www.teinteresa.es/blogs/pregunta_al_medico/epidemiologia/vacunas-combinadas_0_849516891.html). Obtenido de Que son las vacunas combinadas.

Moraga Llop Fernando, J. M. (2008). Vacunas combinadas. *Enfermedades Infecciosas-Microbiología Clínica*, 56-64.

MSP. (2013). *Manual de procedimientos de Subsistema SIVE ALERTA*. Quito.

Norma oficial Mexicana NOM 023-SSA2-94. (2006). *Control, eliminación y erradicación de las enfermedades evitables por vacunación*. México.

Ochoa, R. (2004). *Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos*. La Habana.

Ochoa, R. (2008). *Bases metodológicas para evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas*. La Habana: Finlay. Obtenido de <http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/investigaciones/2daedicionBasesMetodologicasBWEB.pdf>

Ochoa, R. F. (2012). *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunopidemiológicos*. Obtenido de <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>

OMS. (2001). *Potencia de vacunas*. Ginebra.

OMS. (Abril de 2006). [http://www.who.int/immunization/Tetanus\\_vaccine\\_SP.pdf](http://www.who.int/immunization/Tetanus_vaccine_SP.pdf).

OMS. (1 de Marzo de 2008). *Vacuna antitetánica*. Obtenido de Microsoft Word - Tetanus\_vaccine\_\_2006-180\_[1]Mar2008.doc:  
[http://www.who.int/immunization/Tetanus\\_vaccine\\_SP.pdf](http://www.who.int/immunization/Tetanus_vaccine_SP.pdf)

OMS. (2013). En *Manual para Control de Calidad de Difteria, Tétanos y Pertussis* (págs. 165-172). Geneva: WHO/IVB.

OMS. (Septiembre de 2015). *Nota descriptiva # 378*.

- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2015). *Cobertura vacunal mundial 2014*.
- PAI, N. T. (29 de 01 de 2006). <http://www.saludcolombia.com>.
- Parslow. (2002). *Inmunología básica y clínica*. México: Manual Moderno.
- Peel, M. (1980; 8). Measurement of tetanus antitoxin: II toxin neutralization. *J.Biol. Stand.* 191-207.
- Ramirez, Juan Carlos, Fajardo Esther. (2005). Introducción de un ELISA como ensayo alternativo en determinación potencia vacunas antitetánicas. *VacciMonitor*, 1-9.
- Rolando Ochoa, Martinez J. Fajardo E. (2000). Validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano. *VacciMonitor*, 16-21.
- Rolando, O. (2004). Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas. 94.
- Uv.Es. (25 de Noviembre de 2015). *Métodos*. Obtenido de [www.uv.es/webgid/Descriptiva/331\\_mtodos.html](http://www.uv.es/webgid/Descriptiva/331_mtodos.html).
- WHO. (1990). *Technical Report Series, N°800*. Geneva.
- WordPress. (2008). Obtenido de Definición de anticuerpos: <http://definicion.de/anticuerpos/#ixzz41JkA594k>
- World Health Organization . (1997). *Manual of laboratory methods* . Geneva.
- World Health Organization, W. (2001). *Vaccines, Quality Control of DTP*.

## ANEXOS

### ANEXO 1 CARTA DE AUTORIZACIÓN DE ENFARMA E.P.

REPÚBLICA DEL ECUADOR



Guayaquil, 07 de enero de 2016

Doctora Química Farmacéutica  
Jenny Navas Aguilar  
Líder del Subproceso Control Interno de Calidad  
ENFARMA EP

De mi consideración:

En atención a su solicitud realizada mediante comunicación de fecha 04 enero de 2016, tengo a bien responderle que cuenta con la autorización para realizar el estudio de investigación titulado **“Método alternativo para evaluar niveles de anticuerpos antitetánicos en vacunas combinadas”**; en consideración a que generará el conocimiento necesario para implementar y validar este método alternativo en el control de calidad de las vacunas bacterianas combinadas elaboradas por ENFARMA EP.

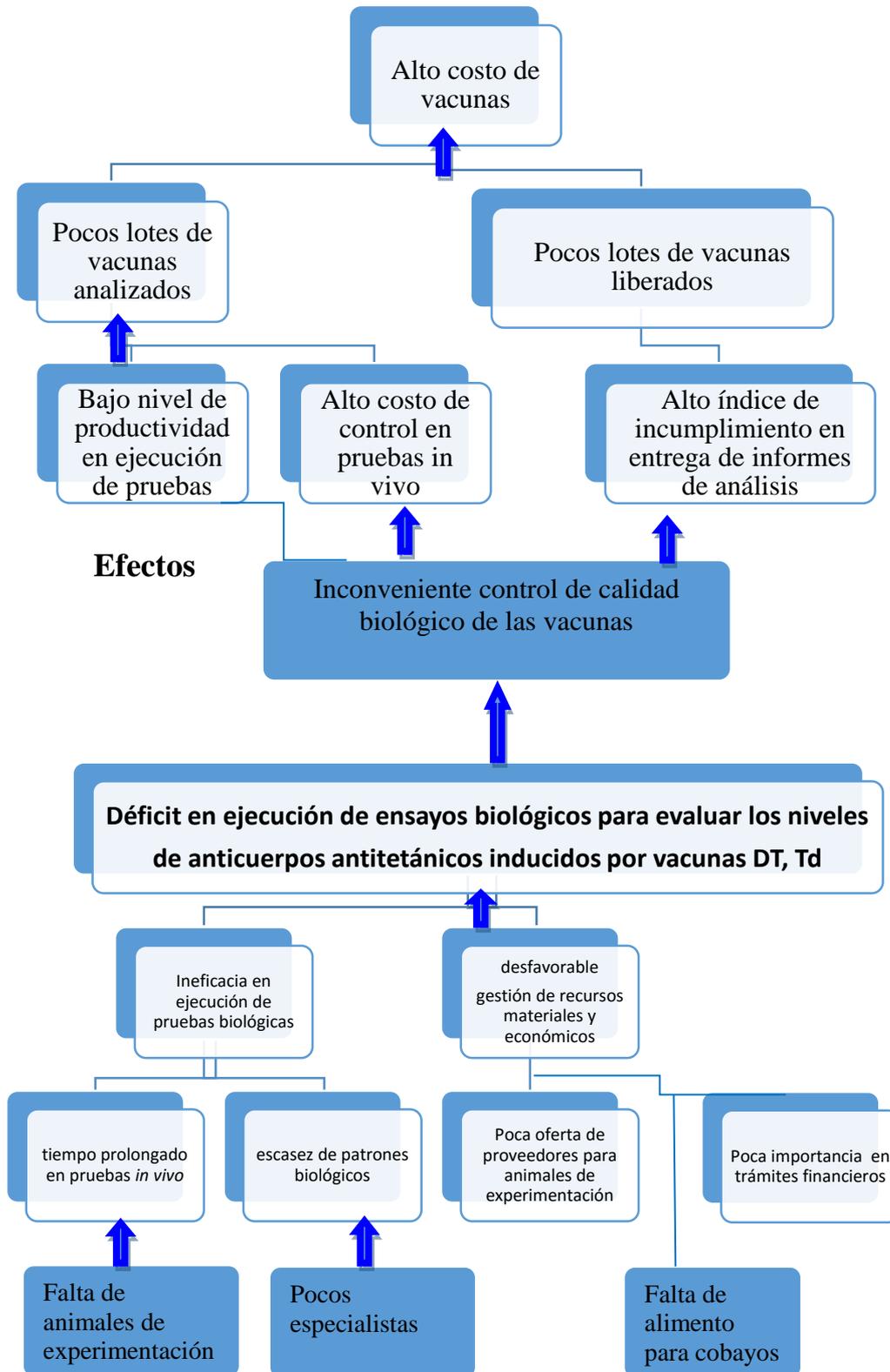
Atentamente,

Dra. Gladys Álvarez Salazar  
COORDINADORA TÉCNICA PRODUCCIÓN BIOLÓGICOS  
ENFARMA EP



## ANEXO 2

### ÁRBOL DE PROBLEMAS



**Causas**

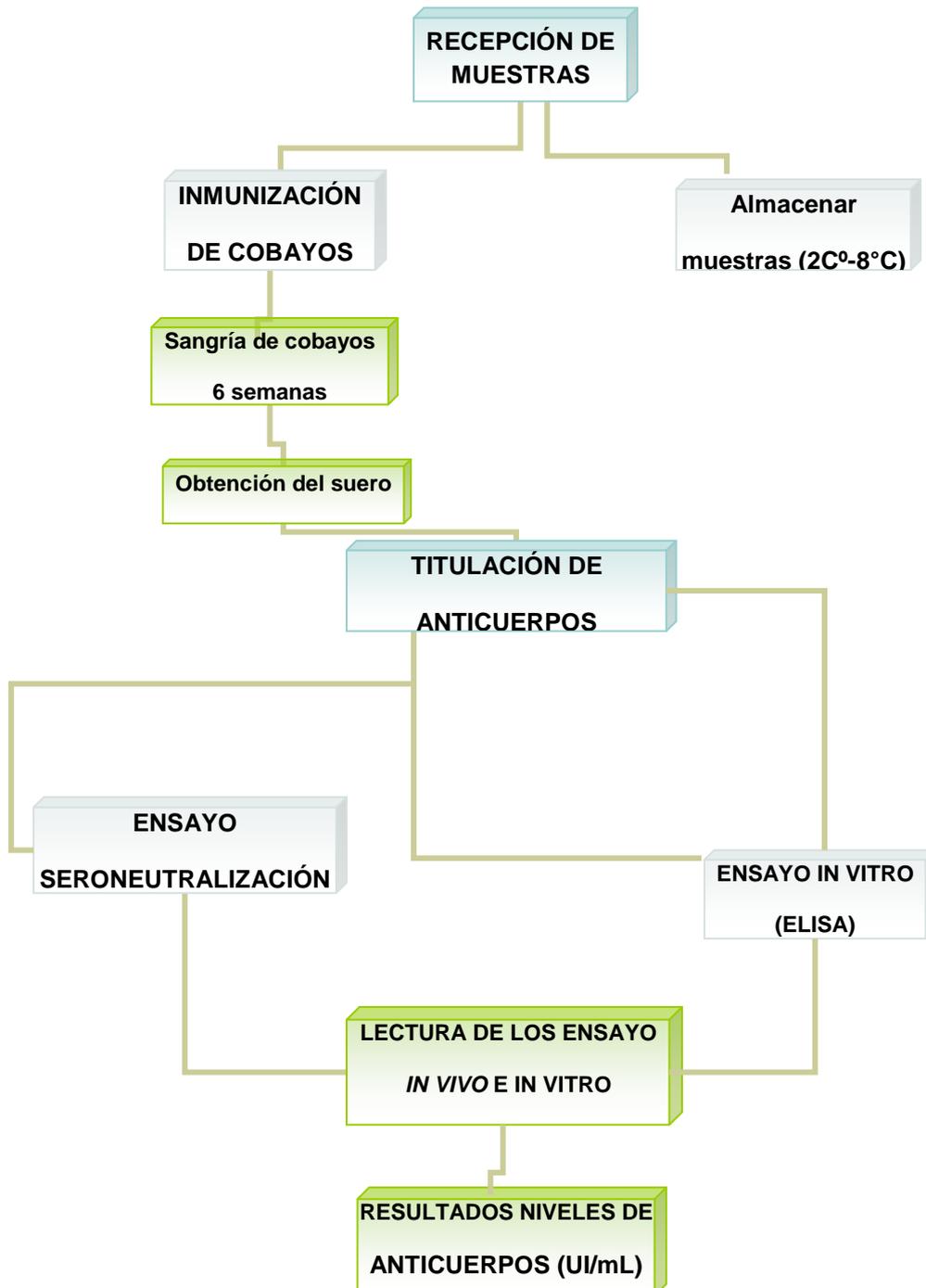
## ANEXO 3

### Tabla C D I U

| Categoría                 | Dimensiones  | Instrumentos  | Unidades de Análisis                        |
|---------------------------|--|---|---|
| <b>Control de Calidad</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vacuna DT</li> <li>• Vacuna Td</li> <li>• Niveles de anticuerpos en mezclas de sueros de cobayos</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• In vivo: Sero neutralización (UI/mL)<br/><i>Tabla 1 y 3.</i></li> <li>• In vitro: ELISA (UI/mL)<br/><i>Gráfico 1 y 3.</i></li> <li>• Concentración<br/><i>Tabla 2 y 4.</i></li> <li>• Diluciones<br/><i>Tabla 2, 4,6 y 7.</i></li> </ul> | Control Interno de Calidad                  |
| <b>Método</b>             | <p style="text-align: center;"><i>In vivo</i></p> <p style="text-align: center;"><i>In vitro</i></p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sero neutralización (UI/mL)<br/><i>Gráfico 2 y 4.</i></li> <li>• ELISA (UI/mL)<br/><i>Gráfico 2, 4,6 y 7.</i></li> </ul>   | Control Interno de Calidad                  |
| <b>Financiera</b>         | Presupuesto  | Análisis documental de la certificación presupuestaria  | Gestión presupuestaria asignada y devengada |

## ANEXO 4

### FLUJOGRAMA DE LA INVESTIGACIÓN



## ANEXO 5

| <b>REGISTRO DE RECOLECCIÓN DE DATOS DEL ENSAYO <i>IN VITRO</i> ELISA</b> |                    |  |       |  |       |       |
|--|--------------------|--|-------|--|-------|-------|
| Muestra / #Lote  | Código de muestra. | Concentración original antígeno de captura (toxóide tetánico). |       | Procedencia/ Elaboración Toxóide tetánico. |       |       |
| Concentración de trabajo toxóide tetánico. (Lf/mL)                       |                    |  |       | Dilución:                                  |       |       |
| Diluciones de suero antitetánico referencia (UI/mL) curva calibración    |                    | Dil 1  | Dil 2 | Dil 3                                      | Dil 4 | Dil 5 |
| Diluciones de suero antitetánico referencia (UI/mL) control positivo     |                    | Dil 1  | Dil 2 | Dil 3                                      | Dil 4 | Dil 5 |
| Dilución de la muestra. Suero control negativo                           |                    | Dilución 1   |       | Dilución 2                                 |       |       |
| Dilución de la muestra problema de vacuna                                |                    | Dilución 1   |       | Dilución 2                                 |       |       |
| Absorbancias a 405 nm  |                    | R1   |       | R2   |       |       |
| <b>RESULTADOS DEL ELISA</b>  |                    |  |       |  |       |       |
| Niveles de antitoxina tetánica   |                    | Nivel 1  |       | Nivel 2                                    |       |       |
| Suero de primera sangría.  |                    |  |       |  |       |       |
| Suero de segunda sangría.  |                    |  |       |  |       |       |
| Observaciones:   |                    |  |       |  |       |       |
| (f) Profesional responsable:   |                    |  |       | Lugar y Fecha:                             |       |       |

## ANEXO 6

### GLOSARIO.

**Anticuerpo.** Sustancia defensora (proteína) sintetizada por el sistema inmunitario como respuesta a la presencia de una proteína extraña (antígeno) que el anticuerpo neutraliza.

**Antitoxina:** Solución de inmunoglobulinas derivadas del plasma de animales (habitualmente caballos) inmunizados con toxinas específicas (toxoides). p. Ej., botulismo, difteria, utilizados para obtener inmunidad pasiva o para efectuar un tratamiento.

**Antitoxina tetánica.** Suero inmune tetánico que neutraliza las exotoxinas de la infección tetánica cuando es producida.

**Antígeno.** Sustancia extraña a un organismo, normalmente una proteína, que desencadena como reacción defensiva la formación de anticuerpos que reaccionan específicamente con el antígeno. Sustancia que provoca una respuesta inmunitaria.

**Lf / mL:** Indicador de la concentración antigénica de los toxoides por mL.

**Toxina.** Producto o componente microbiano que puede lesionar a otra célula u organismo en concentraciones bajas. A menudo, este término se refiere a una proteína venenosa, pero las toxinas pueden ser lípidos y otras sustancias.

**Toxoide.** Una toxina (exotoxina) bacteriana modificada que se ha hecho no tóxica (destoxificada), pero retiene su capacidad para estimular la formación de antitoxina, previniendo así las intoxicaciones bacterianas.

**Vacuna.** Antígeno procedente de uno o varios organismos patógenos que se administra para inducir la inmunidad activa protegiendo contra la infección de dichos organismos. Es una aplicación práctica de la inmunidad adquirida.

## ANEXO 7

# CERTIFICADO DE ANTIPLAGIO



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
CENTRO DE CÓMPUTO

### A QUIEN INTERESE

Certifico que la **DRA JENNY MARÍA NAVAS AGUILAR**, ha presentado el Proyecto de trabajo: **“MÉTODO ALTERNATIVO PARA EVALUAR NIVELES DE ANTICUERPOS ANTITETÁNICOS EN VACUNAS COMBINADAS”**, con el fin de someterse a revisión previo a la obtención del **Grado de Magister en Microbiología**, la misma que ingresó al proceso de revisión de documentos, dando el siguiente resultado: La valoración de los contenidos emitidos por el **SISTEMA PLAGSCAN** refleja un **3.4 %** de similitud o coincidencias con otros trabajos. En el análisis se aplicaron los criterios de valoración establecidos y Directrices para la asignación, distribución y operación de la herramienta de prevención de coincidencias y/o plagio académico por la SENESCYT, correspondientes al criterio 4.2.2.- Criterios de valoración del porcentaje de similitud o plagio, en donde indica que: 1 a 10% no se considera plagio intencional, se puede omitir el reporte y pasar a calificación de trabajo de titulación y trabajos de Facultad.

Guayaquil 11 de marzo del 2016

Atentamente,

  
M.Sc. **JORGE CAMPOVERDE MORI**  
DIRECTOR DEL CENTRO DE CÓMPUTO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

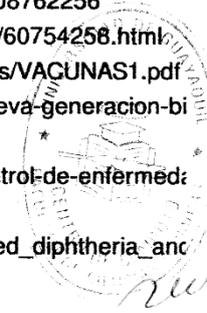


51 resultados de 100 fuentes, de ellos 100 fuentes son en línea.

Nivel del plagio: 3.4%/30.3%

- ✓ [0] (41 resultados, 0.4%/6.5%) de [www.finlay.sld.cu/publicaciones/inyestra...esarrollo clinico de vacunas](http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/inyestra...esarrollo clinico de vacunas)
- ✓ [1] (36 resultados, 0.5%/6.2%) de [www.redalyc.org/pdf/2034/203414599001.pdf](http://www.redalyc.org/pdf/2034/203414599001.pdf)
- ✓ [2] (34 resultados, 0.3%/5.3%) de [www.finlay.sld.cu/publicaciones/inyestra...y estudios inmunoepidemiolo](http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/inyestra...y estudios inmunoepidemiolo)
- ✓ [3] (22 resultados, 1.5%/5.1%) de [scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_art...d.com/1/1/articulos.php?metho](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_art...d.com/1/1/articulos.php?metho)
- ✓ [4] (17 resultados, 1.1%/3.9%) de [scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-028X2008000100002&script=sci\\_a](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-028X2008000100002&script=sci_a)
- ✓ [5] (22 resultados, 0.2%/3.9%) de [www.medigraphic.com/pdfs/vaccimonitor/vcm-2015/vcm151g.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/vaccimonitor/vcm-2015/vcm151g.pdf)  
(+ 2 documentos con coincidencias exactas)
- ✓ [8] (17 resultados, 0.5%/3.2%) de [scielo.sld.cu/scieloOrg/php/articleXML.php?pid=S1025-028X20050001](http://scielo.sld.cu/scieloOrg/php/articleXML.php?pid=S1025-028X20050001)
- ✓ [9] (16 resultados, 0.5%/3.0%) de [www.redalyc.org/pdf/2034/Resumenes/Resumen\\_203414599001\\_1.pd](http://www.redalyc.org/pdf/2034/Resumenes/Resumen_203414599001_1.pd)
- ✓ [10] (16 resultados, 0.5%/2.9%) de [www.redalyc.org/resumen.oa?id=203414599001](http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=203414599001)
- ✓ [11] (16 resultados, 0.5%/2.8%) de [www.oalib.com/search?kw= TOXOIDE TETANICO &searchField=keyw](http://www.oalib.com/search?kw= TOXOIDE TETANICO &searchField=keyw)
- ✓ [12] (16 resultados, 0.5%/2.8%) de [www.oalib.com/search?kw=Peter A. Ubel&searchField=authors](http://www.oalib.com/search?kw=Peter A. Ubel&searchField=authors)  
(+ 1 documento con coincidencias exactas)
- ✓ [14] (16 resultados, 0.4%/2.7%) de [es.slideshare.net/AnclesPerez/elisa-completo](http://es.slideshare.net/AnclesPerez/elisa-completo)
- ✓ [15] (15 resultados, 0.5%/2.7%) de [www.oalib.com/search?kw=María Esther; Bustamante Ramírez&searc](http://www.oalib.com/search?kw=María Esther; Bustamante Ramírez&searc)
- ✓ [16] (16 resultados, 0.3%/2.6%) de [www.medigraphic.com/pdfs/revhabciemed/hcm-2013/hcm134e.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/revhabciemed/hcm-2013/hcm134e.pdf)
- ✓ [17] (16 resultados, 0.3%/2.6%) de [www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/246/169](http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/246/169)
- ✓ [18] (14 resultados, 0.5%/2.5%) de [www.who.int/immunization/Tetanus\\_vaccine\\_SP.pdf](http://www.who.int/immunization/Tetanus_vaccine_SP.pdf)
- ✓ [19] (8 resultados, 0.0%/2.3%) de [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/es/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/es/)
- ✓ [20] (14 resultados, 0.3%/2.1%) de [www.redalyc.org/pdf/1804/Resumenes/Resumen\\_180429299005\\_1.p](http://www.redalyc.org/pdf/1804/Resumenes/Resumen_180429299005_1.p)
- ✓ [21] (12 resultados, 0.0%/2.2%) de [myslide.es/documents/vacunas-de-neuva-generacion.html](http://myslide.es/documents/vacunas-de-neuva-generacion.html)
- ✓ [22] (8 resultados, 0.0%/2.1%) de <https://argentina.campusvirtualsp.org/?q=node/5882>
- ✓ [23] (8 resultados, 0.0%/2.1%) de <https://asgoped.wordpress.com/tag/dia-mundial-de-la-inmunizacion/>
- ✓ [24] (14 resultados, 0.3%/2.1%) de [www.redalyc.org/resumen.oa?id=180429299005](http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=180429299005)
- ✓ [25] (8 resultados, 0.0%/2.1%) de [www.clinicadelcountry.com/noticiaSalud/cobertura-vacunal](http://www.clinicadelcountry.com/noticiaSalud/cobertura-vacunal)
- ✓ [26] (14 resultados, 0.3%/2.1%) de [new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?...=260&IDARTICULO=475](http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?...=260&IDARTICULO=475)
- ✓ [27] (13 resultados, 0.0%/1.9%) de [scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-028X2005000100001&script=sci\\_a](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-028X2005000100001&script=sci_a)
- ✓ [28] (8 resultados, 0.0%/2.1%) de [www.elpatagonico.com/la-cobertura-vacunal-mundial-se-mantiene-firme](http://www.elpatagonico.com/la-cobertura-vacunal-mundial-se-mantiene-firme)
- ✓ [29] (11 resultados, 0.0%/2.0%) de [www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/VACUNAS.pdf](http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/VACUNAS.pdf)
- ✓ [30] (8 resultados, 0.0%/2.0%) de [www.paho.org/uru/index.php?option=com\\_co...nciones-&catid=697:noti](http://www.paho.org/uru/index.php?option=com_co...nciones-&catid=697:noti)
- ✓ [31] (8 resultados, 0.0%/2.0%) de [www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=82086](http://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=82086)
- ✓ [32] (8 resultados, 0.0%/2.0%) de [www.saludarequipa.gob.pe/redislay/boletines/2014/BOLETIN\\_EPI\\_SEM](http://www.saludarequipa.gob.pe/redislay/boletines/2014/BOLETIN_EPI_SEM)
- ✓ [33] (13 resultados, 0.3%/1.8%) de [www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/246](http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/246)
- ✓ [34] (8 resultados, 0.0%/1.9%) de <https://ornella74.wordpress.com/>  
(+ 1 documento con coincidencias exactas)
- ✓ [36] (8 resultados, 0.0%/1.8%) de <https://prezi.com/5lizcfzs5ptz/programa-ampliado-de-inmunizaciones/>
- ✓ [37] (8 resultados, 0.0%/1.7%) de [www.laprensagrafica.com/2015/11/24/escen...nizaciones-en-america-la](http://www.laprensagrafica.com/2015/11/24/escen...nizaciones-en-america-la)
- ✓ [38] (8 resultados, 0.2%/1.7%) de <https://preventiva.wordpress.com/2010/04/22/vacuna-antitetanica/>
- ✓ [39] (8 resultados, 0.2%/1.7%) de [www.somosnoticiacol.com.ve/site/ya-te-pusiste-la-antitetanica/](http://www.somosnoticiacol.com.ve/site/ya-te-pusiste-la-antitetanica/)
- ✓ [40] (8 resultados, 0.1%/1.5%) de [scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1025-028X20150001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1025-028X20150001)
- ✓ [41] (7 resultados, 0.0%/1.5%) de <https://es-us.noticias.yahoo.com/vacunas...millones-muertes-año-18431>
- ✓ [42] (11 resultados, 0.3%/1.5%) de [scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1729-519X2013000](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1729-519X2013000)

- ✓ [43] (7 resultados, 0.0%/1.5%) de [docplayer.es/9628109-Vacunas-de-nueva-ge...n-informe-de-vigilancia-t](http://docplayer.es/9628109-Vacunas-de-nueva-ge...n-informe-de-vigilancia-t)
- ✓ [44] (8 resultados, 0.1%/1.4%) de [scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1025-028X20150001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1025-028X20150001)
- ✓ [45] (4 resultados, 0.0%/1.4%) de [www.tacna.minsa.gob.pe/uploads/epidemiologia/2015/BOLETIN/BOL\\_S](http://www.tacna.minsa.gob.pe/uploads/epidemiologia/2015/BOLETIN/BOL_S)
- ✓ [46] (10 resultados, 0.3%/1.3%) de [scielo.sld.cu/rss.php?pid=1729-519X20130004](http://scielo.sld.cu/rss.php?pid=1729-519X20130004)
- ✓ [47] (5 resultados, 0.0%/1.3%) de [diagnosticodelmedico.blogspot.com/2014/04/las-vacunas-evitan-hasta-](http://diagnosticodelmedico.blogspot.com/2014/04/las-vacunas-evitan-hasta-)
- ✓ [48] (11 resultados, 0.1%/1.3%) de <https://www.scribd.com/doc/301671130/Int...ayo-Alternativo-en-VACU>
- ✓ [49] (4 resultados, 0.0%/1.3%) de <https://www.campusvirtualesp.org/?q=es/aggregator/categorias/2&page=>
- ✓ [50] (4 resultados, 0.0%/1.3%) de [www.tacna.minsa.gob.pe/uploads/epidemiologia/2013/BOL\\_SE\\_33.pdf](http://www.tacna.minsa.gob.pe/uploads/epidemiologia/2013/BOL_SE_33.pdf)
- ✓ [51] (4 resultados, 0.0%/1.2%) de [isanidad.com/61629/los-datos-de-la-oms-que-acaban-con-la-polemica-](http://isanidad.com/61629/los-datos-de-la-oms-que-acaban-con-la-polemica-)
- ✓ [52] (4 resultados, 0.0%/1.1%) de [listindiario.com/la-vida/2013/11/10/299062/OMS-La-inmunizacion-salva-](http://listindiario.com/la-vida/2013/11/10/299062/OMS-La-inmunizacion-salva-)  
(+ 1 documento con coincidencias exactas)
- ✓ [54] (5 resultados, 0.0%/1.1%) de [www.somospacientes.com/noticias/sanidad/...ez-mayor-para-una-efecti](http://www.somospacientes.com/noticias/sanidad/...ez-mayor-para-una-efecti)
- ☐ [55] (9 resultados, 0.0%/1.0%) de [bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol58\\_1\\_06/mtr08106.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol58_1_06/mtr08106.htm)
- ☐ [56] (7 resultados, 0.0%/1.0%) de [www.researchgate.net/publication/2671976...s\\_with\\_Enzyme-linked\\_Im](http://www.researchgate.net/publication/2671976...s_with_Enzyme-linked_Im)
- ✓ [57] (4 resultados, 0.0%/1.0%) de [ddd.uab.cat/pub/butuabcamp/butuabcamp\\_a2013m12n29/index.html.2](http://ddd.uab.cat/pub/butuabcamp/butuabcamp_a2013m12n29/index.html.2)
- ✓ [58] (3 resultados, 0.0%/1.0%) de [www.who.int/topics/immunization/es/](http://www.who.int/topics/immunization/es/)
- ✓ [59] (8 resultados, 0.0%/1.0%) de [www.researchgate.net/publication/2651694...n\\_de\\_la\\_potencia\\_de\\_vac](http://www.researchgate.net/publication/2651694...n_de_la_potencia_de_vac)
- ✓ [60] (5 resultados, 0.2%/1.0%) de <https://www.clubensayos.com/Temas-Variados/Toxoide-Tetnico/1422>
- ☐ [61] (6 resultados, 0.0%/0.9%) de [repository.javeriana.edu.co/bitstream/10.../1/PalaciosBenavidesFabioEd](http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10.../1/PalaciosBenavidesFabioEd)
- ✓ [62] (6 resultados, 0.0%/0.9%) de [amf-semfyc.com/upload\\_articles\\_pdf/Vacunacion\\_del\\_adolescente\\_y\\_d](http://amf-semfyc.com/upload_articles_pdf/Vacunacion_del_adolescente_y_d)
- ✓ [63] (3 resultados, 0.0%/0.8%) de <https://argentina.campusvirtualesp.org/?q=node&page=15&destination=n>
- ☐ [64] (4 resultados, 0.0%/0.8%) de [www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-...-28-articulo-vacunas-combi](http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-...-28-articulo-vacunas-combi)
- ✓ [65] (3 resultados, 0.0%/0.8%) de [www.gacetamedica.com/noticias-medicina/2...dos-en-el-mundo/pagina..](http://www.gacetamedica.com/noticias-medicina/2...dos-en-el-mundo/pagina..)
- ✓ [66] (4 resultados, 0.0%/0.8%) de [oriente20.com/oms-no-vacunar-a-los-ninos-provoca-mas-muertes/](http://oriente20.com/oms-no-vacunar-a-los-ninos-provoca-mas-muertes/)
- ☐ [67] (5 resultados, 0.0%/0.8%) de [www.ispch.cl/encabezado/noticias/doc/TetanoPoster1.doc](http://www.ispch.cl/encabezado/noticias/doc/TetanoPoster1.doc)
- ✓ [68] (3 resultados, 0.0%/0.8%) de [www.pediatribasadaenpruebas.com/2014/04/una-semana-mundial-pa](http://www.pediatribasadaenpruebas.com/2014/04/una-semana-mundial-pa)  
(+ 1 documento con coincidencias exactas)
- ✓ [70] (3 resultados, 0.0%/0.8%) de [www.correofarmaceutico.com/2015/10/20/al...cia-problemas-en-el-acce](http://www.correofarmaceutico.com/2015/10/20/al...cia-problemas-en-el-acce)
- ✓ [71] (4 resultados, 0.0%/0.7%) de [es.slideshare.net/beatrizisabelroblesrio...es-producidas-por-bacterias-vi](http://es.slideshare.net/beatrizisabelroblesrio...es-producidas-por-bacterias-vi)
- ✓ [72] (3 resultados, 0.0%/0.7%) de [educacionsaludsanpablo.blogspot.com/2014\\_04\\_01\\_archive.html](http://educacionsaludsanpablo.blogspot.com/2014_04_01_archive.html)
- ✓ [73] (2 resultados, 0.0%/0.8%) de [es.slideshare.net/griseldaenf/que-es-una-vacuna](http://es.slideshare.net/griseldaenf/que-es-una-vacuna)
- ✓ [74] (4 resultados, 0.0%/0.8%) de [es.slideshare.net/brianmoraAA/ley-orgnica-de-bienestar-animal](http://es.slideshare.net/brianmoraAA/ley-orgnica-de-bienestar-animal)
- ☐ [75] (4 resultados, 0.0%/0.7%) de [www.elsevier.es/en-revista-farmacia-prof...camentos-sujetos-un-seguim](http://www.elsevier.es/en-revista-farmacia-prof...camentos-sujetos-un-seguim)
- ✓ [76] (4 resultados, 0.0%/0.8%) de [www.loba.ec/sitio/index.php/ley-organica...to-de-ley-completo?showall="](http://www.loba.ec/sitio/index.php/ley-organica...to-de-ley-completo?showall=)
- ☐ [77] (3 resultados, 0.0%/0.7%) de [educacionsaludsanpablo.blogspot.com/2014/04/la-semana-mundial-de](http://educacionsaludsanpablo.blogspot.com/2014/04/la-semana-mundial-de)
- ✓ [78] (6 resultados, 0.1%/0.5%) de [https://es.wikipedia.org/wiki/Tos\\_ferina](https://es.wikipedia.org/wiki/Tos_ferina)
- ✓ [79] (3 resultados, 0.0%/0.6%) de [www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-569X200700010](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-569X200700010)
- ✓ [80] (3 resultados, 0.0%/0.6%) de [myslide.es/documents/vacunas-558b0ef0891e1.html](http://myslide.es/documents/vacunas-558b0ef0891e1.html)
- ☐ [81] (2 resultados, 0.0%/0.6%) de [www.lostiempos.com/vida-y-futuro/salud/s...3-millones-de-muertes\\_252](http://www.lostiempos.com/vida-y-futuro/salud/s...3-millones-de-muertes_252)
- ☐ [82] (3 resultados, 0.0%/0.6%) de [www.scielo.cl/pdf/abioeth/v13n1/art05.pdf](http://www.scielo.cl/pdf/abioeth/v13n1/art05.pdf)
- ☐ [83] (7 resultados, 0.0%/0.7%) de <https://www.clubensayos.com/Ciencia/APLICACIONES-ENZIMATICAS-E>
- ✓ [84] (3 resultados, 0.0%/0.6%) de [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X08762256](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X08762256)
- ✓ [85] (3 resultados, 0.0%/0.6%) de [www.buenastareas.com/ensayos/Vacuna-Antitetnica/60754258.html](http://www.buenastareas.com/ensayos/Vacuna-Antitetnica/60754258.html)
- ✓ [86] (2 resultados, 0.0%/0.5%) de [exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/VACUNAS1.pdf](http://exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/VACUNAS1.pdf)
- ✓ [87] (2 resultados, 0.0%/0.5%) de <https://prezi.com/xityyh9ak-a/-copy-of-v...enicades-nueva-generacion-bi>  
(+ 1 documento con coincidencias exactas)
- ✓ [89] (2 resultados, 0.0%/0.5%) de [tsbbenitobios.blogspot.com/2010/11/prevencion-y-control-de-enfermeda](http://tsbbenitobios.blogspot.com/2010/11/prevencion-y-control-de-enfermeda)
- ✓ [90] (2 resultados, 0.0%/0.5%) de [tsbbenitobios.blogspot.com/2010\\_11\\_01\\_archive.html](http://tsbbenitobios.blogspot.com/2010_11_01_archive.html)
- ☐ [91] (3 resultados, 0.0%/0.5%) de [www.researchgate.net/publication/1441682...adsorbed\\_diphtheria\\_anc](http://www.researchgate.net/publication/1441682...adsorbed_diphtheria_anc)



- [92] (3 resultados, 0.0%/0.5%) de <https://investigarentiemposrevueltos.wor...unizate-y-deja-inmunizar/com>
- [93] (2 resultados, 0.0%/0.4%) de <https://es.scribd.com/doc/185425737/vacunas-pdf1>
- [94] (1 resultados, 0.0%/0.5%) de [www.elpatagonico.com/el-concepto-mulligan-n721051](http://www.elpatagonico.com/el-concepto-mulligan-n721051)
- [95] (3 resultados, 0.1%/0.3%) de <https://microbiologia.wordpress.com/2013/04/18/inmunologia-2/>
- [96] (2 resultados, 0.0%/0.4%) de [www.academia.edu/10563249/Validaci%C3%B3nica\\_en\\_suero\\_humano](http://www.academia.edu/10563249/Validaci%C3%B3nica_en_suero_humano)
- [97] (3 resultados, 0.1%/0.3%) de <https://microbiologia.wordpress.com/page/10/>
- [98] (3 resultados, 0.0%/0.3%) de [www.imedicinas.com/pfw\\_files/tpl/tm/data/alg/S.xml](http://www.imedicinas.com/pfw_files/tpl/tm/data/alg/S.xml)
- [99] (2 resultados, 0.0%/0.4%) de [www.researchgate.net/publication/2654389...ayos\\_de\\_potencia\\_para\\_v](http://www.researchgate.net/publication/2654389...ayos_de_potencia_para_v)

### Configuración

Directiva de data: *Comparar con fuentes de internet*  
 Sensibilidad: *Media*  
 Bibliografía: *Considerar Texto*  
 Detección de citas: *Sólo destacado*  
 Lista blanca: --

### Documento analizado

=====1/24=====

#### RESUMEN

En la actualidad las vacunas combinadas son las que tienen mayor aceptación entre la población, el incremento del número de vacunas en los calendarios de inmunizaciones ha hecho progresar la investigación y el desarrollo en los últimos años. El objetivo del presente estudio de caso, es implementar un método alternativo al ensayo de seroneutralización "in vivo", para evaluar los niveles de anticuerpos antitetánicos en vacunas combinadas. Se realizó un ELISA de tipo indirecto para evaluar los anticuerpos en suero de curiel a partir de un estándar certificado por el Instituto Finlay de 32 UI /mL. Se analizaron tres lotes de vacunas DT y tres lotes de vacuna Td, por ambos métodos cuyos resultados demostraron tanto en el ensayo "in vivo" e "in vitro" cumplir la especificación de 2UI/mL, además se demostró una buena similitud entre el ELISA y el ensayo biológico. Los niveles de seroprotección (anticuerpos antitetánicos) de las muestras analizadas en ambos métodos es  $\geq 2$  UI/mL de antitoxina tetánica. Las vacunas DT en el ensayo "in vitro" presentan valores de coeficiente de variación alrededor del 10% y las vacunas Td del 8%; además el coeficiente de determinación (R

2

) de la curva de

calibración es 0.99. El método alternativo por tanto se considera útil en la evaluación de la respuesta inmune de las vacunas combinadas con el toxoide tetánico.

Palabras claves: Método alternativo, ELISA, anticuerpos antitetánicos

#### 1 INTRODUCCIÓN

Las vacunas combinadas presentan mayor grado de aceptación entre la población, debido a que se requiere menos números de dosis inmunizantes para protegerla contra las enfermedades infecciosas. Las vacunas son eficaces si el microorganismo infeccioso experimenta una variación antigénica escasa o nula, y si no interfiere con la respuesta inmunitaria del huésped. Es difícil vacunar de forma eficaz frente a microorganismos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que establece infección latente, es muy variable e inactiva componentes fundamentales del sistema inmunitario().

El tétanos es una enfermedad infecciosa conocida desde la antigüedad, provocada

