



Instituto Nacional
de Salud Pública



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN VACUNOLOGÍA

**Estudio de estabilidad de la vacuna de influenza (AH1N1)
2009, para definir los criterios a seguir en caso de ocurrir
excursiones de temperatura durante la cadena de frío.**

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud.

Presenta:

Q.F.B. José Cruz Bugarín González

Directora de tesis: Dra Lizbel León Solís

Cuernavaca, Morelos. México, marzo 2013

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LOS LABORATORIOS DE CONTROL DE CALIDAD INMUNOQUÍMICO Y FÍSICOQUÍMICO DEL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE PERTENECIENTES A LOS LABORATORIOS DE BIOLÓGICOS Y REACTIVOS DE MÉXICO S.A. DE C.V. (BIRMEX).

DEDICATORIA

A Dios por permitirme concluir este trabajo.

A mis padres, porque siempre me alientan a salir adelante, por el valor de sus palabras de las cuales la perseverancia ha sido la clave para alcanzar mis metas.

A Jessica y Sandra por todo su apoyo en todo momento.

A mi familia por su inquebrantable lucha en esta vida y su apoyo incondicional en todo momento.

A mis amigos de siempre por su leal y sincera amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Salud Pública y Birmex por darnos la oportunidad de ser parte del primer programa de Maestría en Ciencias con área de concentración en Vacunología

Al Dr. José Luis Valdespino (q.e.p.d.) y al Dr. Samuel Ponce de León por haber hecho posible esta Maestría y darnos las facilidades para concluirla.

A todos mis profesores por compartir sus conocimientos ayudándonos a enriquecer nuestro espíritu.

A la Dra. Ma. Eugenia Jiménez, Dra. Gabriela Echaniz, M.C. Nelson Álvarez por todo su tiempo, comentarios e interés, que me permitieron culminar este proyecto

A mi Directora de Tesis, Dra. Lizbel León Solís por todo el apoyo recibido, los conocimientos compartidos y el tiempo dedicado para ver consolidado este trabajo.

Al Dr. José Luis Díaz y Dr. Juvencio Ruíz, por sus valiosos comentarios que me permitieron concluir este trabajo.

A Eloisa Arias, Ramsés Vieyra, Ilse Zainos, Maribel Esparza y Marcos Villanueva por el apoyo, su amistad y el compartir su experiencia durante el desarrollo de este trabajo.

Estudio de estabilidad de la vacuna de influenza (AH1N1) 2009, para definir los criterios a seguir en caso de ocurrir excursiones de temperatura durante la cadena de frío.

CONTENIDO

Lista de tablas	i
Lista de figuras	iii
Lista de gráficos	iv
Resumen	v
1. Antecedentes	1
1.1 Aspectos generales del virus de la influenza.	1
1.2 Cambios antigénicos del virus de la influenza.	3
1.3 Aspectos epidemiológicos del virus de influenza AH1N1.	4
1.4 Producción y control de vacunas de influenza estacionales inactivadas fabricadas en huevos embrionados de pollo.	5
1.5 Producción y control de calidad de la vacuna de influenza pandémica inactivada fabricada en embriones de pollo	9
1.6 Red de frío (cadena de frío) aplicada en vacunas	12
2. Justificación	15
3. Objetivos de la investigación	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. Hipótesis	19
5. Características del estudio	19
5.1 Equipos, materiales y reactivos	19
5.2 Muestras	21
5.3 Materiales de referencia	21
5.4 Métodos	21
5.4.1 Métodos para la determinación de propiedades físicas	22
5.4.1.1 Determinación de pH	22
5.4.1.2 Determinación de aspecto	22
5.4.2 Métodos biológicos	22
5.4.2.1 Determinación de la concentración de antígenos para IDRS	22
5.4.2.2 Método de inmunodifusión radial simple (IDRS)	23
5.4.2.3 Método de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	28
5.5 Métodos estadísticos	29
5.6 Condiciones del estudio	29
6. Implicaciones bioéticas	31
7. Implicaciones de bioseguridad	31

8.	Resultados	31
8.1	Resultados de parámetros fisicoquímicos durante la evaluación de estudios de estabilidad acelerada	31
8.2	Resultados de calibración de las referencias de antígenos y antisueros para vacuna de influenza temporada 2011 – 2012 por el método de IDRS.	33
8.3	Resultados de la concentración de hemaglutinina por el método de IDRS	35
8.4	Resultados de la identificación de la hemaglutinina HA (AH1N1), presentes en las vacunas de influenza, a través del método SDS-PAGE.	48
9.	Discusión de resultados	53
10.	Conclusiones	62
11.	Impactos y perspectivas	63
 Anexo No 1 Preparación de soluciones para el método de IDRS y SDS-PAGE		64
Referencias bibliográficas		66

Lista de tablas

No.	Descripción	Pág.
1	Condiciones de estabilidad acelerada	19
2	Materiales de referencia (antígenos)	21
3	Materiales de referencia (antisueros)	21
4	Especificaciones y métodos empleados en el estudio	22
5	Calibración de antígenos para el método de IDRS	23
6	Ajuste de la cantidad de antisuero necesario para las placas de IDRS	23
7	Esquema de diluciones para la calibración de antígenos en la prueba de IDRS	23
8	Diluciones de prueba para el método de IDRS	26
9	Esquema para el estudio de estabilidad en condiciones aceleradas de almacenamiento	29
10	Matriz de pruebas realizadas a -20°C +/- 5°C	30
11	Matriz de pruebas realizadas a +5°C +/- 3°C	30
12	Matriz de pruebas realizadas a +25°C +/- 2°C	30
13	Matriz de pruebas realizadas a +37°C +/- 2°C	31
14	Resultados de las pruebas de pH y aspecto del lote H7137	32
15	Resultados de las pruebas de pH y aspecto del lote H7138	32
16	Resultados de las pruebas de pH y aspecto del lote H7145	33
17	Resultados de calibración de antígenos y antisueros para cada cepa de influenza de la temporada 2011-2012	34
18	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa A/California/7/2009 a -20 °C +/- 5°C:	36
19	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para A/California072009 a -20°C +/- 5°C.	36
20	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa A/California/7/2009 + 25 °C +/- 2°C	37
21	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para A/California072009 a + 25°C +/- 2°C.	37
22	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa A/California/7/2009 + 5 °C +/- 3°C	38
23	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para A/California072009 a + 5°C +/- 2°C.	38
24	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa A/California/7/2009 + 37 °C +/- 2°C	39
25	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para A/California072009 a + 37 °C +/- 2°C	39
26	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa A/Perth/16//2009 California/7/2009 -20 °C +/- 5°C	40

No.	Descripción	Pág.
27	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para A/Perth/16/2009 -20 °C +/- 5°C +/- 5°C	40
28	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa A/Perth/16//2009 California/7/2009 + 25 °C +/- 2°C	41
29	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para A/Perth/16/2009, +25 °C +/- 2°C	41
30	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa A/Perth/16//2009 California/7/2009 + 5 °C +/- 3°C	42
31	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para A/Perth/16/2009, + 5 °C +/- 3°C	42
32	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa A/Perth/16//2009 California/7/2009 + 37 °C +/- 2°C	43
33	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para A/Perth/16/2009, + 37 °C +/- 2°C	43
34	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa B/Brisbane/60//2008 -20 °C +/- 5°C	44
35	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para B/Brisbane/60/2008, -20 °C +/- 5°C	44
36	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa B/Brisbane/60//2008 + 25 °C +/- 2°C	45
37	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para B/Brisbane/60/2008, + 25 °C +/- 2°C	45
38	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa B/Brisbane/60//2008 + 5 °C +/- 3°C	46
39	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para B/Brisbane/60/2008, + 5 °C +/- 3°C	46
40	Valores estimados del contenido de hemaglutinina por el método de IDRS, para la cepa B/Brisbane/60//2008 + 37 °C +/- 2°C	47
41	Prueba de paralelismo y modelo de regresión lineal para B/Brisbane/60/2008, + 37 °C +/- 2°C	47
42	Determinación de la masa molecular (P.M.), de la hemaglutinina AH1N1 en la vacuna de influenza estacional por el método de SDS-PAGE.	48
43	Resultados de la masa molecular para la referencia de hemaglutinina AH1N1 para el método de SDS PAGE	48

Lista de figuras

No.	Descripción	Pág.
1	Estructura del virus de influenza	1
2	Esquema de la hemaglutinina del virus de la influenza	2
3	Modelo tridimensional de la hemaglutinina del virus de influenza	3
4	Distribución de casos confirmados de influenza A (H1N1) según la fecha de inicio de síntomas, México, 11 de marzo al 16 de julio del 2009	5
5	Esquema del proceso anual del desarrollo, fabricación y distribución de vacunas contra la influenza	9
6	Las etapas de la fabricación de la vacuna contra la gripe pandémica y su duración disponible	11
7	Vacunas afectadas por congelación	14
8 y 9	Interior de cámaras refrigeradoras de Birmex ubicadas en la planta de Cuautitlán Estado de México, utilizadas para el almacenamiento de vacunas que produce y comercializa en todo el territorio nacional	15
10	Excursiones de temperatura en vacunas de influenza temporada 2010-2012	16
11 y 12	Preparación del gel de agarosa al 1% m/v en PBS 1X.	24
13	Referencias de antisueros y antígenos utilizados para la estandarización, obtenidos del National Institute for Biological Standards and Controls (U.K.).	24
14	Perforación de las placas de agarosa con 49 pozos de 4 mm de diámetro	25
15	Esquema de la reacción de antígeno (hemaglutinina) y anticuerpo (antisuero-anti hemaglutinina), para formar los halos de precipitación	27
16	Placa con los halos de reacción y hardware con pc, escáner de doble dimensión, software Immulab v 4.0 para adquisición de imágenes.	28
17	Equipo Invitrogen® para desarrollar el método de electroforesis en geles de poliacrilamida, a).- Fuente de poder, b).- cámara de electroforesis y c).- soporte de electrodos	29
18	Fotografías de los geles de poliacrilamida para la cepa AH1N1 a -20°C / 30 días	49
19	Fotografías de los geles de poliacrilamida para la cepa AH1N1 a +5°C / 30 días	50
20	Fotografías de los geles de poliacrilamida para la cepa AH1N1 a +25°C / 30 días	51
21	Fotografías de los geles de poliacrilamida para la cepa AH1N1 a +37°C / 30 días	52

Lista de gráficos

No.	Descripción	Pág.
1	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa A/California/07/2009 a -20°C	36
2	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa A/California/07/2009 a +25°C	37
3	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa A/California/07/2009 a +5°C	38
4	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa A/California/07/2009 a +37°C	39
5	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa A/Perth/16/2009 a -20°C	40
6	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa A/Perth/16/2009 a +25°C	41
7	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa A/Perth/16/2009 a +5°C	42
8	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa A/Perth/16/2009 a +37°C	43
9	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa B/Brisbane/60/2008 a -20°C	44
10	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa B/Brisbane/60/2008 a +25°C	45
11	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa B/Brisbane/60/2008 a +5°C	46
12	Estabilidad de la vacuna de influenza para la cepa B/Brisbane/60/2008 a +37°C	47
13	Identificación de HA de AH1N1 presente en la vacuna de la influenza estacional a - 20 °C	49
14	Identificación de HA de AH1N1 presente en la vacuna de influenza estacional a + 5 °C	50
15	Identificación de HA de AH1N1 presente en la vacuna de la influenza estacional a + 25 °C	51
16	Identificación de HA de AH1N1 presente en la vacuna de la influenza estacional a + 37 °C	52

Resumen

Derivado de la aparición a partir del mes de abril del 2009, de casos de influenza asociados con el resurgimiento de un nuevo virus y a la situación de pandemia declarada por la OMS, la industria farmacéutica tuvo que responder rápidamente con el desarrollo de una vacuna contra el nuevo virus A/H1N1 2009. Los productores que enviaron vacunas pandémicas a México, transportaron la vacuna en condiciones que aseguraron el mantenimiento de la cadena de frío. El abasto oportuno de vacuna de calidad fue fundamental para proteger a la población durante la emergencia del 2009, en una pandemia, sin embargo en algunas ocasiones la red de frío se vio comprometida porque existieron variaciones de temperatura (excursiones) durante el transporte de las vacunas a los centros de distribución,

Si los fabricantes desarrollan evaluaciones de la estabilidad del producto considerando estas posibles pérdidas de potencia en algún punto de la cadena de frío, se puede contar con la evidencia científica por anticipado y podemos utilizar esta información como herramienta para inferir sobre el comportamiento del producto a través de la degradación que muestran sus componentes en estudios de estabilidad, esta información con toda la que existe respecto a pruebas de control de calidad e inspecciones de aseguramiento de la calidad, ayudan a liberar el producto de una manera más eficiente.

Como objetivo central de este trabajo me dedique a evaluar la estabilidad de la vacuna de influenza para demostrar el grado de afectación de la potencia del producto en caso de ocurrir excursiones de temperatura durante el manejo de la cadena de frío.

Los estudios de degradación acelerada llevados a cabo en este protocolo de investigación nos aportaron resultados valiosos para la toma de decisiones en el manejo y almacenamiento de este tipo de vacunas de influenza, sobre todo cuando está en duda la calidad de una cantidad de vacunas que por su volumen representa la continuidad inclusive del programa de vacunación planeado, Este trabajo aporta resultados relevantes para evaluar la estabilidad intrínseca de cada una de las cepas que forman parte de la vacuna trivalente de influenza, se estableció la pérdida en potencia que presenta por hora cada una de las cepas que componen la vacuna, adicionalmente se corroboró que el método más sensible para la cuantificación e identificación de la hemaglutinina fue el método de Inmunodifusión radial simple (IDRS), porque detecta la hemaglutinina activa.

Por último los estudios de estabilidad acelerada son una herramienta que se pueden utilizar en todo el desarrollo y aún después de obtener la licencia del producto, para pronosticar el impacto que tiene en el biológico la exposición a temperaturas diferentes a las condiciones normales de almacenamiento