
**Eventos supuestamente atribuibles a la vacunación
o la inmunización graves asociados
a la administración de la vacuna antiamarílica
durante una campaña de vacunación masiva
Perú, 2007**

**Hallazgos y recomendaciones
de un grupo de expertos**

Washington, D.C., marzo del 2008

Índice

Miembros del Grupo de Expertos	5
Siglas	7
Introducción	9
Características clínicas y patológicas de los casos	10
Investigaciones epidemiológicas y búsqueda de nuevos casos	11
Incidencia de la YEL-AVD en el Departamento de Ica	12
Análisis virológicos y posible relación causal entre los ESAVI y el lote 121 Z.	12
Inspección de las instalaciones de producción de Bio-Manguinhos.	13
Principales conclusiones del grupo de expertos.	14
Recomendaciones	15
a) Comunicación de la información.	15
b) Investigación adicional de los casos	15
c) Mejoramiento de la información sobre la incidencia de ESAVI y los factores de riesgo.	16
d) Otras.	16
Anexos:	
1. Resúmenes de los casos (casos 1 al 4)	19
2. Informe de caso de posible enfermedad viscerotrópica no fatal asociada a la vacuna antiamarílica	27
3. Protocolo para la investigación de ESAVI de fiebre amarilla en Ica, Perú, 2007.	31
4. Informe del Subcomité de Virología investigando los ESAVI en el Departamento de Ica, Perú, septiembre–octubre del 2007 . . .	41

Miembros del Grupo de Expertos

Thomas P. Monath, MD (Presidente)

Kleiner Perkins Caufield & Byers Pandemic and Biodefense Fund (Estados Unidos)

Edward B. Hayes, MD

Actividad de Vigilancia y Epidemiología de la Subdivisión de Enfermedades por Arbovirus de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Estados Unidos)

Martin Cetron, MD

División de Migración Mundial y Cuarentena de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Estados Unidos)

Alan D. T. Barrett, MD

Centro para la Biodefensa y las Enfermedades Infecciosas Emergentes de la División Médica de la Universidad de Texas en Galveston (Estados Unidos)

Expedito Luna, MD

Instituto Butantan (Brasil)

La investigación de ESAVI graves que ocurrieron en octubre del 2007 después de la administración de la vacuna antiamarílica (sub-cepa 17 DD) fabricada por Bio-Manguinhos en Brasil fue llevada a cabo por el personal de la Unidad de Inmunización de la OPS (Área de Salud Familiar y Comunitaria) en colaboración con el personal de la Unidad de Medicamentos Esenciales, Vacunas y Tecnologías de la Salud (Área de Tecnología y Entrega de Servicios de Salud) y el personal de la Unidad de Calidad, Seguridad y Estándares de la OMS (Salud Familiar y Comunitaria).

Siglas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Estados Unidos)
INS	Instituto Nacional de Salud (Perú)
GACVS	Comité Consultivo Mundial sobre Seguridad de las Vacunas (OMS)
GTA	Grupo Técnico Asesor sobre Enfermedades Prevenibles por Vacunación de la OPS
GI	Gastrointestinal
iARN	Interferencia por ácido ribonucleico
ESAVI	Evento supuestamente atribuible a la vacunación o la inmunización
LES	Lupus eritematoso sistémico (Lupus)
NMRCD	Destacamento del Centro Naval de Investigación Médica (Estados Unidos)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
SAGE	Strategic Advisory Group of Experts (Grupo Estratégico Asesor de Expertos de la OMS)
SDRA	Síndrome de dificultad respiratoria aguda
YEL-AND	Enfermedad neurotrópica asociada a la vacuna anti amarílica
YEL-AVD	Enfermedad viscerotrópica asociada a la vacuna anti amarílica

Eventos supuestamente atribuibles a la vacunación o la inmunización graves asociados a la administración de la vacuna antiamarillica durante una campaña de vacunación masiva Perú, 2007

Introducción

La fiebre amarilla sigue constituyendo un importante problema de salud pública en las regiones tropicales de América del Sur y África, y existe el riesgo de su introducción y propagación en regiones no endémicas infestadas por el vector urbano *Aedes aegypti*. Aproximadamente, 50% de los casos notificados en la Región de las Américas corresponden al Perú. Durante los siete últimos años, se han notificado 331 casos en el Perú, con una tasa de letalidad de 50%. Durante el 2007 y el 2008, se ha producido en Brasil un resurgimiento de la actividad del virus de la fiebre amarilla, con una extensión hacia el sur de una onda epizootica, y casos humanos asociados, en Paraguay y Argentina. En los suburbios de Asunción, en Paraguay, se han producido los primeros casos en muchos años de fiebre amarilla urbana (transmitida por *Aedes aegypti*). No existe un tratamiento específico para la fiebre amarilla. La vacunación con la vacuna de virus vivos atenuados 17D sigue siendo la medida más eficaz para la prevención y el control de la fiebre amarilla. Con el importante apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), la mayor parte de los países pertenecientes a la región endémica incorporan actualmente las vacunas de virus 17D en su Programa Ampliado de Inmunización (PAI). Además, se han llevado a cabo campañas masivas de vacunación en los siguientes escenarios: a) vacunaciones de puesta al día; b) cuando se producen incrementos de la actividad viral, o como respuesta a brotes entre la población humana; y c) en entornos especiales, tales como las zonas limítrofes con la región endémica desde se producen frecuentes migraciones poblacionales hacia ésta, o allí donde se considera que existe el riesgo de introducción y propagación del virus. Durante más de 70 años, se ha administrado la vacuna 17D a cientos de millones de personas y existe una larga experiencia de confianza en su seguridad y eficacia. No obstante, recientemente se ha reconocido la necesidad de adoptar nuevas precauciones con relación a las vacunas antiamarillicas 17D como consecuencia de la aparición de eventos supuestamente atribuibles a la vacunación o la inmunización (ESAVI) infrecuentes pero graves.

La enfermedad viscerotrópica asociada a la vacuna antiamarillica (YEL-AVD por su sigla en inglés) constituye una complicación rara pero potencialmente fatal descrita por primera vez en la bibliografía médica en el año 2001. En septiembre del 2007, ya se habían notificado en todo el mundo 36 casos de YEL-AVD tras la administración de la vacuna antiamarillica (subcepas 17D y 17DD) de cinco diferentes fabricantes. La media de edad era de 49 años (intervalo de 4 a 79 años), la relación hombre:mujer era de 2:1, y la tasa de letalidad era de 60%. Como factores de riesgo se han notificado la edad superior a 60 años y las enfermedades del timo o la timectomía.

En septiembre y octubre del 2007, después de un intenso terremoto, se llevó a cabo una campaña masiva de vacunación contra la fiebre amarilla en el Departamento de Ica (Perú) donde se administraron unas 63.000 dosis. Se produjeron cinco casos sospechosos de YEL-AVD entre las personas vacunadas con la subcepa 17DD, con edades comprendidas entre 23 y 79 años. Era la primera vez en que aparecían agrupados múltiples casos de YEL-AVD en un breve periodo (los pacientes fueron vacunados entre el 23 de septiembre y el 1 de octubre del 2007) y en un espacio delimitado (Departamento de Ica). Murieron cuatro personas (tasa de letalidad de 80%). Los cuatro casos fatales pertenecían a una población aproximada de 43.000 personas que habían recibido un lote específico de la vacuna 17DD (designado 050VFA-121Z y denominado en lo sucesivo como 121Z) elaborado por Bio-Manguinhos del Brasil, un productor precalificado por la OMS. Otro lote de la vacuna elaborada por Bio-Manguinhos (el 123Z) se había administrado a unas 20.000 personas durante la misma campaña masiva sin que se produjera ningún caso de YEL-AVD. Se desconoce el lote de la vacuna administrada en el quinto caso (no fatal, pero hospitalizado). No se notificaron ESAVI cuando se administró el lote 121Z en Venezuela antes de utilizarse en el Perú. Sin embargo, este dato debe interpretarse con cierta cautela dada la limitada sensibilidad de los sistemas de vigilancia pasiva de los ESAVI.

El 2 de noviembre del 2007, la OPS/OMS emitió una declaración¹ para alertar a la comunidad mundial de salud pública sobre la aparición y la investigación de estos eventos. La declaración proporcionaba información preliminar sobre los cuatro casos fatales y describía una serie de actividades de investigación planeadas para determinar la contribución etiológica de la vacuna antiamarillica en los ESAVI, analizar el proceso de fabricación y control del lote de vacuna implicado, mejorar la vigilancia de la aparición de ESAVI, y llevar a cabo nuevos estudios de búsqueda de casos en el Perú. Se interrumpió la administración del lote 121Z y otros lotes relacio-

1 Eventos adversos fatales posteriores a la vacunación antiamarillica en Perú con vacuna producida por Bio-Manguinhos, Brasil. Puede consultarse en: <http://www.paho.org/Spanish/AD/FCH/IM/ComunicacionOPS-OMSFiebreAmarilla.pdf>

dados, en espera de los resultados de la investigación de su posible papel causal en los ESAVI. El 1.º de noviembre, se convocó a un grupo de expertos para analizar los datos preliminares y dirigir la investigación. El Grupo de Expertos se reunió nuevamente los días 4 y 5 de marzo del 2008, junto con los representantes del Ministerio de Salud del Perú, el fabricante de la vacuna (Bio-Manguinhos) y el personal de la OPS/OMS. Este informe resume los resultados y las conclusiones de las investigaciones de laboratorio y sobre el terreno realizadas entre noviembre del 2007 y febrero del 2008.

Características clínicas y patológicas de los casos

Los pacientes afectados presentaban un síndrome similar, resumido en el cuadro 1. Los cuatro primeros casos habían recibido la vacuna anti-tamariánica por primera vez; se desconocen los antecedentes previos de vacunación del quinto caso.

Cuadro 1. Características clínicas y patológicas de los casos de YEL-AVD en el Perú, 2007

Caso	Edad y sexo	Enfermedades previas	Días entre la vacunación y		Síntomas o signos	Alteraciones de laboratorio (las mayores desviaciones de las cifras normales)	Resultados y hallazgos destacados de la autopsia	Cumple la definición de caso
			el inicio	la muerte				
1	23/M	Rosácea	1	9	Fiebre, cefalea, artralgias, mialgias, malestar general, náuseas, vómitos, diarrea. 8 días después de la vacunación presentó shock, SDRA, acidosis, encefalopatía, falla multiorgánica.	Leucocitos: 66.400/mm ³ Plaquetas: 54.000/mm ³ AST: 850 U/l ALT: 222 U/l Creatinina: 4,1mg/dl; CPK 4055 U/l	Muerte. Necrosis mediozonal, esteatosis (hígado); necrosis tubular aguda; neoplasia tiroidea, tiroiditis crónica	YEL-AVD confirmada
2*	24/M		<1	14	Fiebre, cefalea, malestar general, mialgias, náuseas, vómitos, diarrea. 11 días después de la vacunación presentó shock, encefalopatía, acidosis, hemorragia gastrointestinal, ictericia, SDRA, falla multiorgánica.	Hematocrito: 15,5% Leucocitos: 11.470/mm ³ Plaquetas: 15.000/mm ³ AST: 850 U/l ALT: 222 U/l Bilirrubina: 6,2 mg/dl BUN: 112 mg/dl CPK: 3173 U/l	Muerte. Esteatosis, necrosis focal (hígado); edema cerebral; edema pulmonar; infección grave por <i>Cándida</i> (laringe, tráquea, estómago)	YEL-AVD confirmada
3	79/V	Cardiopatía	3	11	Fiebre, malestar general, disnea, dolor abdominal, vómitos, diarrea. 9 días después de la vacunación presentó shock progresivo, SDRA, acidosis, insuficiencia renal.	Leucocitos: 17.400/mm ³ Plaquetas: 249.000/mm ³ AST: 416 U/l ALT: 231 U/l Bilirrubina: 2,9 mg/dl Creatinina: 2,8 mg/dl	Muerte. Necrosis mediozonal, esteatosis (hígado); necrosis tubular aguda; depleción de la pulpa blanca (bazo); congestión	YEL-AVD confirmada
4* §	49/M	Lupus sistémico y artritis reumatoide	Impreciso (de 7 a 18 días)	30	Cefalea, malestar general, artralgias. 29 días después de la vacunación, hospitalización con edema generalizado, ictericia, estado mental alterado, hemorragia, acidosis, dificultad cardiorrespiratoria	Hematocrito: 31% Leucocitos: 5.530/mm ³ Plaquetas: 57.000/mm ³ AST: 123 U/l Bilirrubina: 5,2 mg/dl Creatinina: 3,3 mg/dl	Muerte. Necrosis mediozonal, esteatosis (hígado); necrosis tubular aguda y glomerulonefritis; edema pulmonar	YEL-AVD confirmada
5	43/V		4	--	Fiebre, cefalea, malestar general, diarrea. Ingresado en la UCI, posible encefalopatía, ictericia escleral. La fiebre cedió y se dio de alta 16 días después de la vacunación.	AST: 158 U/l (normal 2-35) ALT: 244 U/l (normal 9-43) Bilirrubina: 0,5 mg/dl	Sobrevivió	Probable YEL-AVD

M=mujer; V=varón

* A los pacientes 2 y 4 se les administraron inyecciones de un medicamento potencialmente inmunodepresor (dexametasona) durante la fase inicial de la enfermedad.

§ El paciente 4 también podría haber tomado metotrexato y prednisona (fármacos inmunodepresores) por vía oral después de que se le administrara la vacuna. Nota: Todos los pacientes recibieron tratamiento con antibióticos.

El Grupo de Expertos llegó a las siguientes conclusiones después de analizar los casos:

- El síndrome presente en los casos 1 a 3 concordaba con los informes de casos previos de YEL-AVD.
- Las características del caso número 4 fueron atípicas ya que se prolongaron, y el síndrome probablemente fue modificado por la enfermedad autoinmunitaria subyacente (LES) o por los medicamentos inmunodepresores administrados a la paciente.
- La diarrea era una característica prominente en esta serie y fue grave en varios casos. También se ha observado la pres-

encia de diarrea en informes de casos anteriores y parece que forma parte del síndrome de YEL-AVD. Se desconoce el mecanismo patogénico y deberían llevarse a cabo investigaciones sobre los efectos sobre el tracto gastrointestinal de la infección por el virus de la fiebre amarilla y el daño que ocasiona.

- En ninguno de los casos existía una contraindicación clara para la vacunación. Sin embargo, el caso número 3 presentaba un factor que requería una cierta precaución (la edad avanzada, un conocido factor de riesgo de YEL-AVD). En general, las personas de esta edad no deben recibir la vacuna a menos que exista un claro riesgo de exposición al virus salvaje.
- El tratamiento con medicamentos inmunodepresores podría haber favorecido la infección por el virus de la vacuna en los casos 2 y 4. Deben adoptarse precauciones para que no se utilicen este tipo de fármacos durante los diez días posteriores a la vacunación contra la fiebre amarilla (es decir, hasta que aparece la inmunidad); este tipo de precauciones deberían ser analizadas y aceptadas por la autoridad reguladora pertinente.
- El Grupo de Expertos señaló que la presencia de una enfermedad autoinmunitaria podría constituir un nuevo factor de riesgo de ESAVI después de la vacunación contra fiebre amarilla. Uno de los cinco casos aparecidos en el Perú padecía artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico y el caso número 1 padecía una tiroiditis que se detectó en la autopsia. Al menos otros dos casos anteriores de YEL-AVD (en Brasil y Estados Unidos) también padecían lupus.
- La infección por *Cándida* en el caso número 2 fue probablemente secundaria al tratamiento con antibióticos y a la enfermedad sistémica grave, y no el reflejo de una supresión inmunitaria primaria preexistente.
- Con la posible excepción del caso número 3, en el que se observó una conversión serológica para los antígenos típicos O y H, no existían indicios de una infección concurrente por un agente no relacionado que pudiera explicar la gravedad o el desenlace de la enfermedad en los pacientes afectados de YEL-AVD. Por otro lado, tampoco había indicios de una exposición común a algún agente ambiental o tóxico, ni de medicamentos que hubieran tomado todos los pacientes. No obstante, debe reconocerse que no se ha realizado ninguna investigación sistemática sobre la posible intervención de otro agente infeccioso en estos casos de YEL-AVD.
- El Grupo de Expertos observó que el manejo y el tratamiento de los pacientes con YEL-AVD fueron difíciles ya que se disponía de pocas directrices. La última reunión dedicada al tratamiento de los pacientes con fiebre amarilla (de tipo salvaje) fue organizada por la OPS hace más de 20 años (en 1985).

Investigaciones epidemiológicas y búsqueda de nuevos casos

En el Perú, se ha establecido un sistema de vigilancia de los ESAVI. En noviembre del 2007, miembros del personal del Ministerio de Salud y de otras instituciones asociadas del Perú y de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), establecidos en Fort Collins (Estados Unidos), llevaron a cabo nuevas investigaciones retrospectivas de búsqueda de casos. Los datos del sistema de vigilancia y las investigaciones sobre el terreno ya existentes permitieron detectar un total de 11 casos sospechosos de ESAVI graves:

- Seis de los casos notificados pertenecían al Departamento de Ica. Uno de ellos posteriormente se consideró que no cumplía las definiciones operativas de caso de YEL-AVD ni de YEL-AND (enfermedad neurotrópica asociada a la vacuna antiamarílica, por su sigla en inglés). La búsqueda retrospectiva de casos no encontró nuevos casos sospechosos de YEL-AVD ni de otros ESAVI graves.
- Los sistemas de vigilancia de otras regiones detectaron cinco casos de ESAVI graves tras la vacunación contra la fiebre amarilla aunque ninguno había recibido el lote 121Z, incluido un caso de defunción en un lactante de 20 meses. Este caso fatal se investigó virológicamente y no se detectó el virus de la fiebre amarilla mediante pruebas de infectividad, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) o inmunohistoquímicas. La causa de la muerte fue una anemia hemolítica. Se investigaron otros casos no fatales pero no se sospechó que ninguno de ellos fuera un caso de YEL-AVD.

El Grupo de Expertos resaltó el hecho de que el sistema de vigilancia existente se había mostrado sensible y había detectado todos los casos fatales y un caso no fatal de YEL-AVD en la zona de Ica, lo que había llevado a la interrupción inmediata de la campaña de vacunación en ese departamento. A pesar de que se llevó a cabo un intenso estudio de más de 28.000 registros hospitalarios del Departamento de Ica, no se descubrió ningún otro caso.

Las autoridades peruanas no disponían de un protocolo de investigación de los ESAVI asociados a la vacuna antiamarílica, que inclu-

vera los procedimientos de recolección, manipulación y análisis de las muestras serológicas y virológicas. Se señaló que en el Brasil ya se había elaborado un protocolo que podría facilitar la investigación sistemática de los posibles futuros casos que se produjeran en toda las regiones donde se administran vacunas contra la fiebre amarilla.

Incidencia de la YEL-AVD en el Departamento de Ica

En esta ocasión, la incidencia de la YEL-AVD en el Departamento de Ica fue significativamente mayor a la observada previamente en otros entornos. Se produjeron cinco casos de YEL-AVD entre las 63.174 personas que recibieron la vacuna antiamarílica durante los meses de septiembre y octubre del 2007 en la provincia de Ica (lo que supone una tasa de 7,9 por 100.000). Si se toma como denominador el número total de personas a las que se administró el lote 121Z, es decir 42.724, la incidencia sería de 9,4 por 100.000 si sólo fueran cuatro los casos que recibieron ese lote, y de 11,7 por 100.000 si se hubiera administrado en los cinco casos. En los viajeros a los que se ha administrado la vacuna antiamarílica en los Estados Unidos y en Europa, la incidencia general de YEL-AVD es aproximadamente de 0,3 a 0,4 casos por 100.000. Si se considera que esta tasa es la real, la probabilidad de que aparezcan cuatro casos cuando se administran 42.742 dosis es extremadamente pequeña (0,00001).

También resultó imprevisible la asociación de los cuatro casos fatales con un único lote (121Z) de la vacuna, mientras que no se detectaban casos similares entre las personas que habían recibido el otro lote de la vacuna administrado de forma simultánea en Ica, ya que, hasta la fecha, nunca se había producido más de un caso de YEL-AVD asociado a un único lote de vacuna. Aproximadamente, 42.742 personas recibieron en Ica el lote (121Z) de vacuna implicado. Otras 20.432 personas fueron vacunadas en el mismo Departamento con otro lote (050-VFA123Z) y no se notificó ninguna defunción en este grupo. La incidencia de YEL-AVD fatal asociada con el lote 121Z no es estadísticamente significativa en comparación con la del otro lote para un valor $p < 0,05$ y, por lo tanto, es posible que la asociación con uno de los lotes sucediera por casualidad. (Aún suponiendo que el caso no fatal hubiera recibido el lote 121Z, la diferencia en la incidencia de YEL-AVD entre ambos lotes no es significativa para un valor $p < 0,05$.)

Se consideraron diversas hipótesis para explicar la mayor tasa de YEL-AVD observada en Ica, incluidas la alteración de la patogenicidad del virus vacunal, la alteración de la sensibilidad de las personas que experimentaron los ESAVI y la alteración de la sensibilidad de la población en su conjunto. La posibilidad de que en el lote 121Z se hubiera producido un cambio genético responsable del aumento de su virulencia fue objeto de una investigación extensa, que se resume a continuación. Los posibles factores del huésped (edad avanzada, enfermedad autoinmunitaria) pueden haber contribuido a una mayor sensibilidad en dos de los cuatro casos.

El grupo de expertos señaló que los factores poblacionales probablemente fueron muy importantes en esta ocasión. Los casos se produjeron en el escenario de una campaña de vacunación masiva llevada a cabo en una zona no endémica, donde no se habían administrado previamente vacunas antiamarílicas, donde la población no estaba previamente inmunizada contra la fiebre amarilla, donde se vacunó a un gran número de adultos, incluidas personas ancianas, y donde se había reforzado la vigilancia de eventuales ESAVI. El grupo de expertos consideró que el riesgo de YEL-AVD en ese escenario era sustancialmente mayor que en otros entornos donde se llevan a cabo campañas masivas de vacunación en zonas endémicas en las que existen altos niveles de inmunidad previa contra la fiebre amarilla. Para poder definir mejor el riesgo de YEL-AVD en América del Sur y determinar si el episodio ocurrido en Ica es aberrante o no, debe darse una alta prioridad a la obtención de datos sobre la incidencia de YEL-AVD en otras circunstancias similares donde se hayan realizado campañas masivas de vacunación fuera de la zona enzoótica, tal como la llevada a cabo en la zona oriental del Estado de São Paulo en Brasil, y en Paraguay y Argentina donde se realizan actualmente campañas masivas de vacunación.

Análisis virológicos y posible relación causal entre los ESAVI y el lote 121Z

El diagnóstico de laboratorio de los casos fue realizado por el Instituto Nacional de Salud del Perú, el Destacamento del Centro Naval de Investigación Médica de los Estados Unidos (NMRC) y los CDC de Atlanta y Fort Collins. El estudio reveló una amplia distribución tisular del virus (incluidos muchos órganos vitales), una intensa viremia, una alta carga viral y elevados títulos de anticuerpos, todo ello compatible con los informes previos de casos de defunciones consecutivas a la vacunación contra la fiebre amarilla. En tres casos, también se determinaron las secuencias genómicas del ARN viral. Los resultados se resumen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Diagnóstico de laboratorio. Casos probables y confirmados de enfermedad viscerotrópica asociada a la vacuna contra la fiebre amarilla en el Departamento de Ica Perú, 2007

Caso	Días transcurridos entre la vacunación y la muerte	Aislamiento del virus	ARN viral en tejidos (PCR)	Antígeno viral en tejidos	Anticuerpos	Secuencia del genoma
1	9	Positivo: S, H, C (Negativo: O, P, R, B)	Positivo: S, O, P, H, R, C (Negativo: ninguno)	Positivo: P, H, R, C (Negativo: Ninguno)	IgM+ PRNT 1:160	ARN del pulmón: secuencia consenso completa indistinguible de la semilla secundaria 17DD de Bio-Manguinhos (102/84)
2	14	Positivo: Ninguno (Negativo: C, R, H, P, S, O, B)	Positivo: S, O, P, H, R, C (Negativo: B)	Positivo: P, H, R (Negativo: C)	IgM+ PRNT 1:10.240	ARN del hígado: secuencia consenso completa indistinguible de la semilla secundaria 17DD de Bio-Manguinhos (102/84), a excepción de un cambio nucleotídico no codificante a nivel del nt 4921 en el gen NS3
3	11	Positivo: Ninguno (Negativo: C, R, H, P, S, B)	Positivo: S, P, H, R, C, B (Negativo: ninguno)	Positivo: H, B (Negativo: P, R, C)	IgM+ (PRNT NR)	Secuencia parcial (nucleótidos 1550 a 2870 y 6235 a 8435) indistinguible de la semilla secundaria 102/84
4	30	Positivo: Ninguno (Negativo: S, H, R, C, B)	Positivo: S, H, R (Negativo: C)	Positivo: R (Negativo: P, H, C)	IgM+ PRNT >1: 20.480	No se dispone de datos sobre la secuencia
5	No fatal	NR	NR	NR	IgM+ (PRNT NR)	NR

S = suero; O = orina; P = pulmón; H = hígado; R = riñón; C = cerebro; B = bazo.

NR = no realizado. PRNT = Prueba de Neutralización por Reducción de Placas

Nota: Los análisis se realizaron en cuatro laboratorios diferentes: INS (Perú), NMRCDC (Perú), CDC (Fort Collins) y CDC (Atlanta). Si al analizar una muestra se obtenía un resultado positivo en uno de los laboratorios, se registraba como positivo aunque los resultados de los otros laboratorios fueran negativos.

Bio-Manguinhos notificó que se había determinado la secuencia consenso genómica total del lote 121Z sin que se observara ningún cambio en la semilla secundaria 102/84. El Grupo de Expertos aún no había analizado estos datos. Por otra parte, en los CDC de Fort Collins se secuenciaron parcialmente (gen E) aproximadamente 75 clones de cada uno de los tres lotes de vacuna elaborados por Bio-Manguinhos, incluidos los lotes 121Z y 123Z utilizados en Ica. El análisis clonal confirmó que las vacunas contenían un “enjambre genético” de múltiples subpoblaciones del viriones que diferían aproximadamente en 0,15% de sus aminoácidos. Este análisis no permitió sacar conclusiones con respecto a cualquier cambio relacionado con los ESAVI.

Aún más importante fue el hallazgo de que las secuencias consenso virales del lote 121Z obtenidas de los órganos vitales de tres de los casos confirmados de YEL-AVD eran indistinguibles del lote parental de semilla secundaria 17DD utilizado desde 1984. Estos resultados aportan pruebas fehacientes de que el virus de la vacuna es genéticamente estable y de que no se produjo ninguna mutación durante la replicación en el huésped afectado, ni selección de una subpoblación variante de la vacuna que fuera responsable de un incremento de su virulencia. Si se hubiera producido una mutación o una selección que fuera responsable del daño tisular y orgánico observado en estos casos de infecciones graves, sería previsible que el virus alterado representara al menos el 10% de la población total de viriones y, por tanto, se pudiera detectar en una secuencia consenso.

Un laboratorio contratado por la OMS analizó mediante un ensayo de infectividad validado las muestras de retención del fabricante y las muestras de la vacuna usada en Ica correspondientes al lote 121Z al final de su período máximo de almacenamiento. No se observaron cambios en la potencia entre las muestras distribuidas inicialmente y las muestras obtenidas al final del período máximo de almacenamiento, lo que confirmó los resultados del fabricante, el INS y los CDC, que indicaban que no existían modificaciones (disminución) de la dosis o cambios en la potencia de ese lote de vacuna.

El grupo de expertos recalzó la importancia de que la OMS creara un depósito de muestras y virus de las vacunas relacionados con los casos de YEL-AVD para futuros estudios, cuando se dispusiera de nuevos avances científicos y métodos tecnológicos que permitieran dilucidar la patogénesis de la YEL-AVD.

Inspección de las instalaciones de producción de Bio-Manguinhos

Un equipo integrado por miembros de la OPS/OMS, los CDC y el grupo de expertos llevó a cabo una visita para examinar los registros de producción de los lotes y las instalaciones de fabricación. No se observaron anomalías ni otros problemas que pudieran repercutir en la calidad del producto en relación con los ESAVI. Se recomendó que, durante los diferentes pasos del proceso de fabricación, se

conservaran muestras de los productos intermedios (por ejemplo, los matraces de suspensión viral) de cada lote de producción hasta su fecha de caducidad, con objeto de apoyar cualquier investigación futura, y que se conservaran indefinidamente viales representativos de los lotes implicados en un ESAVI viscerotrópico. Actualmente, solo se conservan muestras de los envases finales hasta que alcanzan la fecha de caducidad, en cuyo momento se desechan. Se recomendó realizar un análisis excepcional del lote 121Z en busca de agentes humanos sobreañadidos accidentalmente para excluir la remota posibilidad de un contaminante en este lote. Aunque no existe un modelo animal validado para poner a prueba la reversión hacia el viscerotropismo, debe considerarse la posibilidad de realizar estudios experimentales *in vivo*. Se debe conservar indefinidamente una muestra del lote 121Z y de otros lotes afines seleccionados con objeto de permitir ese tipo de estudios en el futuro.

El grupo de expertos fue informado sobre la programación de la revisión de los Requisitos de la OMS en materia de Vacuna Antiamarílica² (redactados en 1998) y alentó vivamente el debate sobre la importancia del análisis genético lote a lote durante este proceso.

Principales conclusiones del grupo de expertos

El grupo de expertos llegó a las siguientes conclusiones:

- La aparición de múltiples casos de YEL-AVD agrupados en tiempo y espacio y asociados con un solo lote de vacuna antiamarílica (el 050VFA-121Z, de Bio-Manguinhos en Brasil) no tenía precedentes.
- La incidencia de YEL-AVD, comprendida entre 7,9 y 11,7 casos por 100.000, es más de 20 veces superior a la previamente notificada. La incidencia entre las personas que recibieron el lote 121Z no fue estadísticamente superior (para un valor $p < 0,05$) a la observada entre las personas que recibieron un lote diferente (123Z) durante la campaña masiva.
- La investigación mostró datos probatorios clínicos, virológicos y patológicos de YEL-AVD confirmada en cuatro casos fatales y de probable YEL-AVD en un caso sobreviviente. La causa de la muerte fue una infección masiva por el virus 17DD de la vacuna, probablemente asociada con un síndrome grave de respuesta inmunitaria.
- La determinación de la secuencia consenso del genoma del lote 121Z de la vacuna, de un lote parental de semilla secundaria y del ARN viral de los pacientes indicó que no se había producido ningún cambio genético en la secuencia consenso del virus de la vacuna que pudiera haber causado los casos de YEL-AVD.
- No se descubrió indicio alguno virológico o relativo al proceso de producción sugestivo de alguna anomalía intrínseca del lote 121Z de la vacuna que permitiera explicar la mayor frecuencia de YEL-AVD entre las personas que recibieron ese lote.
- El sistema de vigilancia de los ESAVI en el Perú se mostró sensible. No se detectaron otros casos fatales de YEL-AVD en Ica tras una revisión retrospectiva de los registros hospitalarios y de defunciones.
- Los factores del huésped y otros factores desconocidos pueden haber aumentado el riesgo de infección grave por 17DD, incluidas la edad avanzada en un caso y la enfermedad autoinmunitaria (lupus) en otro. En dos de los casos, se administró medicación potencialmente inmunodepresora después de la vacunación. Hasta este momento, la enfermedad autoinmunitaria no se considera como un factor de riesgo reconocido, pero debe prestarse más atención a este aspecto en el futuro. La aparente asociación de la diarrea con los casos de YEL-AVD indica la posible participación directa del virus de la fiebre amarilla en la infección del tracto gastrointestinal o como cofactor agregado a otro agente infeccioso.
- En este brote, probablemente fueron importantes los factores poblacionales entre los cuales se incluye el extenso uso de la vacuna antiamarílica en adultos (muchos de los cuales tenían factores de riesgo, tales como la edad avanzada) en una zona no endémica, con una población a la que nunca anteriormente se había administrado la vacuna contra la fiebre amarilla y, por consiguiente, carecía de inmunidad protectora.

2 Organización Mundial de la Salud. WHO Expert Committee on Biological Standardization: forty-sixth report. Annex 2: Requirements for Yellow Fever Vaccine. WHO Technical Report Series No. 872, 1998. Se puede consultar el documento en: http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/yellow_fever/WHO_TRS_872_A2.pdf.

Recomendaciones

El grupo de expertos formuló las siguientes recomendaciones. Estas recomendaciones comprenden un conjunto de actividades que deben llevarse a cabo para conocer mejor el riesgo de ESAVI asociados con las vacunas antiamarílicas y los pasos que se deben seguir para reducir ese riesgo, así como para guiar el tratamiento clínico de tales casos, mejorando así posiblemente los resultados.

a) Comunicación de la información

- El riesgo de comunicar la información acerca de estos ESAVI debe equilibrarse con la comunicación de información acerca de los riesgos de padecer la fiebre amarilla y sobre la eficacia de la vacuna en su prevención.
- La OPS debe hacer llegar este informe a los grupos de expertos internacionales, tales como el SAGE, el GTA y el GAVCS.
- La OPS debe recopilar un informe completo de las investigaciones sobre estos ESAVI y publicarlo.

b) Investigación adicional de los casos

- El Grupo de Trabajo de Virología del Grupo de Expertos debe diseñar un programa de investigaciones encaminado a dilucidar con mayor detalle los factores causales subyacentes a estos casos de enfermedades viscerotrópicas. Los temas del programa deben ser los siguientes:
 - Ampliar la evaluación virológica de los casos de YEL-AVD aparecidos en Ica, lo que incluye:
 - considerar la posibilidad de secuenciar las cepas virales del caso 1;
 - considerar la posibilidad de tratar de obtener una cepa viral de los casos 2 a 4 mediante pasaje a ciegas;
 - secuenciar el ácido nucleico viral del caso 4;
 - considerar la posibilidad de comparar la virulencia del lote 121Z con la de otros lotes mediante la puesta a prueba en animales;
 - ampliar la caracterización del ARN viral tisular procedente de los casos afectados; y
 - analizar los lotes de vacuna 121Z en busca de agentes infecciosos sobreañadidos.
 - Analizar el ADN del huésped en los cuatro casos fatales para detectar posibles factores genéticos determinantes de un aumento de sensibilidad.
 - Considerar la posibilidad de evaluar más ampliamente los factores del huésped entre los sobrevivientes de una YEL-AVD con objeto de poder explorar más a fondo la función del sistema inmunitario (inmunidad innata). Ello implicaría la obtención de monocitos de sangre periférica y podría incluir un estudio de la activación de los receptores de tipo toll y la inducción de genes estimulados por el interferón en respuesta a virus 17D, estudios genéticos de los genes de la 2',5' oligoadenilato sintetasa y otros estudios que podría diseñar un grupo de expertos.
 - Considerar la posible función del virus de la vacuna antiamarílica y de otros agentes infecciosos como cofactores de la YEL-AVD.
- La OPS/OMS debe tomar medidas para garantizar la conservación indefinida de muestras de los casos de YEL-AVD, de las cepas virales y del lote 121Z (y otros lotes afines), y ponerlas a disposición de investigadores *bona fide* en el futuro que pudieran haber elaborado nuevas herramientas para determinar su causalidad y patogénesis.
- La OMS debe elaborar un protocolo de investigación de la YEL-AVD. Este protocolo debe incluir:
 - la descripción de las características de la YEL-AVD (incluidas la posibilidad de un inicio rápido y la diarrea);
 - las definiciones de casos de YEL-AVD y YEL-AND;
 - las directrices para la evaluación clínica de los casos o el procedimiento de la autopsia, según corresponda;
 - las directrices sobre las muestras que deben obtenerse, con instrucciones apropiadas para su manipulación y envío; y
 - la especificación de los laboratorios de referencia a donde deben enviarse las muestras para la realización de pruebas específicas.
- La OMS debe colaborar con los investigadores o las instituciones pertinentes con objeto de analizar nuevamente los informes previos de los casos de YEL-AVD y verificar la relevancia de la diarrea como característica clínica de esta enfermedad.

-
- La OPS/OMS debe considerar la posibilidad de revisar las directrices para el tratamiento clínico de los casos de fiebre amarilla e incluir el tratamiento de la YEL-AVD y la YEL-AND, valorando, por ejemplo, el uso de antibióticos profilácticos, el tratamiento de apoyo, y el manejo de la respuesta inflamatoria sistémica y la falla multiorgánica. También debe evaluarse la situación y la disponibilidad en materia de medicamentos antivirales, anticuerpos e iARN, entre otros.

c) Mejorar la información sobre la incidencia de ESAVI y los factores de riesgo

- Los países deben considerar la posibilidad de establecer registros de las vacunaciones en tiempo real, usando bases de datos que se puedan consultar por vía informática, siempre que se administren vacunas antiamarílicas, ya sea durante las campañas de vacunación o en las vacunaciones regulares.
- Después de las campañas de vacunación contra la fiebre amarilla, los países deben considerar la posibilidad de monitorear a las poblaciones vacunadas, con la inclusión de estudios epidemiológicos y basados en el laboratorio, a fin de evaluar la tasa de cobertura de la vacunación y el seguimiento de las recomendaciones en materia de vacunación, ya sea, por ejemplo, en las poblaciones con mayor riesgo o en las personas vacunadas durante la campaña. Los resultados de tales estudios deben servir para establecer directrices más claras en cuanto a las precauciones y las contraindicaciones que se deben tener en cuenta cuando se administren vacunas antiamarílicas. Se debe verificar la incidencia de ESAVI asociados con las vacunas durante las campañas realizadas fuera de la región endémica, donde no existe una intensa inmunidad previa entre la población, por ejemplo, Argentina, Brasil (zona oriental del Estado de São Paulo) y Paraguay. Se deben determinar las tasas específicas por sexo y edad y, si fuera posible, las tasas para otras categorías de riesgo. La incidencia debe expresarse utilizando los mismos denominadores, por ejemplo, x por 100.000 dosis.
- La OMS debe revisar la información contenida en los prospectos de la vacuna antiamarílica (información sobre el producto) de los diferentes fabricantes con objeto de garantizar que se proporcione información adecuada y actualizada sobre los posibles ESAVI. Se deben adoptar nuevas precauciones para evitar el uso de las drogas inmunodepresoras durante los diez días posteriores a la vacunación contra la fiebre amarilla (es decir, hasta que se desarrolle la inmunidad).
- La OMS y los países deben considerar la posible función de las afecciones autoinmunitarias, tales como el lupus eritematoso sistémico, la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y la artritis reumatoide, como potenciales factores de riesgo de YEL-AVD grave.
 - Obtener estimaciones de la prevalencia general de diversas afecciones autoinmunitarias y compararla con la prevalencia de estas enfermedades entre los casos de YEL-AVD.
 - Verificar las enfermedades subyacentes en los casos futuros.
- Los países deben considerar la posibilidad de proporcionar a todos los proveedores de atención sanitaria y a las personas vacunadas un sencillo folleto informativo sobre las indicaciones y las contraindicaciones de la vacuna y sus potenciales ESAVI.
- La OPS/OMS debe promover la recopilación de datos específicos sobre la incidencia de YEL-AVD (y YEL-AND) en zonas endémicas y no endémicas (donde la inmunidad previa frente a la fiebre amarilla es reducida), por ejemplo, Argentina y la región oriental del Estado de São Paulo (Brasil).

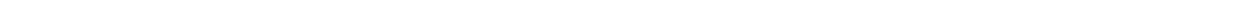
d) Otras

- Se deben obtener más datos sobre los resultados de la vacunación con el lote 121Z en Venezuela, ya que aproximadamente unas 70.000 personas recibieron este lote antes de que fuera empleado en el Departamento de Ica, y se desconoce el grado de sensibilidad del sistema de vigilancia de ESAVI.
- Se deben revisar los Requisitos de la OMS en materia de Vacuna Antiamarílica (redactados en 1998), teniendo en cuenta la importancia del análisis genético.

**Eventos Supuestamente Atribuibles a la Vacunación
o la Inmunización graves asociados
a la administración de la vacuna antiamarílica
durante una campaña de vacunación masiva
Perú, 2007**

A n e x o s

Anexo 1
Resúmenes de los casos (casos 1 al 4)



Resúmenes de los casos

Caso 1 (RCQ)

a) Resumen clínico:

Esta mujer de 23 años de edad, estudiante de Medicina en Ica (Perú), recibió la vacuna antiamarilica correspondiente al lote 050VFA121Z (producida por Bio-Manguinhos en Brasil; con fecha de caducidad en octubre del 2007) mediante inyección subcutánea el 27 de septiembre del 2007. Entre sus antecedentes médicos solo destacaba un acné rosáceo diagnosticado en el 2005. La entrevistada con la familia de la paciente reveló que esta era su primera dosis de vacuna antiamarilica (no se disponía de ningún registro de salud que lo confirmara). No se conocían antecedentes de tratamientos farmacológicos habituales, alergias ni enfermedades agudas durante el mes anterior a la administración de la vacuna antiamarilica, ni de viajes recientes.

Un día después de la vacunación, inició un cuadro de malestar general, fiebre (39,5°C), cefalea, artralgias y mialgias. Trató sus síntomas con paracetamol, a una dosis de 3g al día durante cuatro a cinco días. También tomó metamizol (un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, no disponible en los Estados Unidos desde 1977) a una dosis no especificada. Cinco días después de la vacunación, recibió una inyección intramuscular de metamizol con mejoría posterior de la fiebre, pero no de los otros síntomas. Durante los dos días siguientes, presentó náuseas, vómitos y diarrea con cuatro a cinco deposiciones acuosas por día, de color amarillento. Al día siguiente (ocho días después de la vacunación), acudió al Departamento de Urgencias del Hospital Regional de Ica y fue ingresada con los diagnósticos de gastroenteritis y deshidratación. Recibió tratamiento con líquidos, dimenhidrinato y ciprofloxacino, todo ello por vía intravenosa.

El recuento inicial de leucocitos fue de 14.500/mm³, con 86% de neutrófilos y 10% de linfocitos. Los valores de hemoglobina y plaquetas (150.000/mm³) eran normales. También se obtuvieron los siguientes valores: aspartato-aminotransferasa (AST) 78 U/l, alanina-aminotransferasa (ALT) 65 U/l, fosfatasas alcalinas 243 U/l, bilirrubina total 0,85 mg/dl, albúmina 3,8 g/dl, creatinina 1,6 mg/dl y urea 50 mg/dl.

Su estado se deterioró a lo largo del primer día de ingreso (el octavo día después de la vacunación) ya que apareció hipotensión, acidosis metabólica (pH en sangre 7,191 y pCO₂ 18,5 mmHg) e insuficiencia renal aguda. Posteriormente, presentó agitación psicomotora e insuficiencia respiratoria que requirió entubación, ventilación mecánica y colocación de un catéter venoso central en la unidad de shock y trauma a primera hora de la mañana de su segundo día de ingreso (el noveno día después de la vacunación). Se creyó que la insuficiencia de sistemas multiorgánica y la encefalopatía eran causadas por un shock séptico o una reacción adversa grave a la vacuna antiamarilica. Fue tratada con ciprofloxacino, ceftriaxona, hidrocortisona, furosemida, dopamina y bicarbonato de sodio intravenosos.

Su recuento de leucocitos aumentó a 66.400/mm³, con 91% de neutrófilos (28% de cayados) y 8% de linfocitos. Las plaquetas disminuyeron hasta valores de 54.000/mm³. La aspartato aminotransferase (AST) aumentó a 850 U/l, la alanina aminotransferase (ALT) a 222 U/l, el Cociente Internacional Normalizado (INR) era de 3,2 y la creatinina de 4,1. Los valores de lactato sérico eran de 140 mmol/l y los de creatinina cinasa (CK) de 4.055. Una prueba de aglutinación de antígeno tífico O obtuvo un título de aglutininas de 1/160. Entre los estudios adicionales, la radiografía del tórax mostraba congestión pulmonar con sombras hiliares prominentes, y en la ecografía se observó hepatoesplenomegalia, ascitis y derrames pleurales bilaterales. El coprocultivo fue negativo.

Su presión arterial sistólica descendió a 60 mmHg a pesar del tratamiento con vasopresores. Durante el segundo día de ingreso el shock no respondió al tratamiento médico y murió (nueve días después de la vacunación).

b) Resultados de los análisis serológicos:

Los estudios serológicos realizados en el Instituto Nacional de Salud (INS) del Perú no mostraron datos probatorios de infección reciente por VIH, hantavirus, virus de la hepatitis B, leptospirosis, virus Mayaro, virus Oropuche, ni virus de la encefalomielite equina venezolana.

c) Resultados post mortem (estudio microscópico):

Las muestras tisulares post mortem examinadas en los CDC y el INS mostraron lo siguiente: el tejido hepático presentaba necrosis mediozonal difusa, esteatosis microvesicular difusa e infiltrados mixtos dispersos de células inflamatorias; el riñón presentaba necrosis tubular aguda y hemorragia focal; en el pulmón se observaba edema intraalveolar y congestión vascular; el cerebro mostraba edema y gliosis discreta (estos hallazgos en el cerebro solo fueron observados en el INS).

En la Morgue Central del Instituto de Medicina Legal se descubrió la presencia de neoplasia tiroidea y tiroiditis crónica.

d) Pruebas específicas relacionadas con la vacuna antiamarillica:

En el suero obtenido nueve días después de la vacunación, se detectó IgM contra el virus de la fiebre amarilla (VFA), pero la determinación mediante ELISA de IgG contra el VFA era negativa (no es extraño que la prueba de ELISA para detectar IgG anti VFA sea negativa después de la vacunación antiamarillica). La prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) obtuvo un título de anticuerpos anti VFA de 1:160.

La RT-PCR mostró la presencia de ARN del VFA 17D en suero, orina, hígado, pulmón, riñón y cerebro (INS y CDC). Se cultivó el VFA 17D a partir de las muestras post mortem de suero, hígado y cerebro (INS y CDC). En los CDC, se determinó la carga viral mediante PCR en tiempo real. Se detectaron cantidades altas de VFA 17D en pulmón ($7,6 \times 10^6$ PFUeq/ml) y suero ($3,9 \times 10^6$ PFUeq/ml), y valores de $3,5 \times 10^5$, $3,9 \times 10^4$, $1,2 \times 10^4$ y $6,8 \times 10^1$ PFUeq/ml en riñón, cerebro, hígado y orina, respectivamente. La carga viral en suero se determinó a partir de una muestra obtenida nueve días después de la vacunación. La secuencia del ARN viral obtenido del tejido pulmonar fue idéntica a la secuencia de referencia para la cepa 17 DD del virus de la vacuna antiamarillica.

En los CDC, mediante estudio inmunohistoquímico (IHQ), se detectó antígeno del VFA 17D con abundante y extensa tinción en hígado, pulmón y riñón, y escasa tinción en el sistema nervioso central (SNC). El estudio IHQ realizado en INS del Perú sólo proporcionó un resultado con tinción positiva en hígado.

Caso 2 (GSAL)

a) Resumen clínico:

Esta mujer de 24 años de edad de la Provincia de Chíncha (Departamento de Ica) recibió la vacuna antiamarillica correspondiente al lote 050VFA121Z (producida por Bio-Manguinhos en Brasil; con fecha de caducidad en octubre del 2007) mediante inyección subcutánea el 27 de septiembre del 2007. Entre sus antecedentes médicos destacaba una caída desde un árbol a la edad ocho años que provocó un traumatismo craneoencefálico no especificado, con la aparición subsiguiente, años después, de cefaleas intermitentes que empeoraban en épocas de estrés psicológico. También había dado a luz un niño normal nacido a término el 4 de julio del 2007. Los registros indican que era alérgica a la yema del huevo y también a algún medicamento no especificado. La entrevista con la familia de esta mujer reveló que esta era su primera dosis de vacuna antiamarillica (no se disponía de ningún registro de salud que lo confirmara). No se conocían antecedentes de medicación habitual, enfermedad aguda durante el mes anterior a la administración de la vacuna ni de algún viaje reciente. Trabajaba como peluquera antes de que ocurriera el terremoto de Ica (15 de agosto del 2007). Según la información procedente del hospital de Lima, también criaba conejillos de India, y, según su esposo, solo trabajaba ayudándole a él en un mercado callejero, donde ella solía comer. También criaba gallinas, gatos, perros y palomas.

Durante la noche del 27 de septiembre (día de la vacunación), la paciente empezó a tener cefalea, malestar general, mialgias y fiebre (con temperatura no registrada), durante nueve a diez días. Siete días después de la vacunación, presentó náuseas, vómitos y diarrea con tres a cuatro deposiciones líquidas de color amarillo por día. Los registros indican que fue evaluada en el consultorio de un médico entre el tercer y el octavo día posteriores a la vacunación, en cuyo momento se le diagnosticó una infección de las vías urinarias y un trastorno intestinal, y se le administraron 500 mg de amikacina por vía intramuscular. También se le prescribió ciprofloxacino oral (500 mg) y dexametasona (4 mg). Se desconocen las dosis totales prescritas de estos medicamentos y no se sabe si llegó a tomarlos. Su esposo señaló que la frecuencia de la diarrea aumentó hasta 10 a 20 deposiciones diarias en el décimo día después de la vacunación. El undécimo día después de la vacunación, un médico la visitó en su domicilio y le diagnosticó deshidratación y shock con diarrea acuosa de etiología desconocida y posible hiponatremia. Este médico le administró una inyección desconocida para "protección hepática" (posiblemente un preparado vitamínico) y aconsejó a la paciente que acudiera al departamento de urgencias del hospital.

El undécimo día después de la vacunación, su esposo la llevó al Departamento de Urgencias del Hospital de Chíncha, donde la exploración inicial detectó una presión arterial de 60/30 mmHg, una frecuencia cardíaca de 108/min., una frecuencia respiratoria de 26/min. y una temperatura de 36°C. La exploración mostró una disminución del estado de conciencia, sequedad de boca y mucosas, retraso del relleno capilar, taquipnea sin ruidos respiratorios anormales y taquicardia sin arritmia. Su abdomen era blando y no doloroso. Se solicitaron análisis básicos de laboratorio. El recuento de leucocitos era de 16.300 con 87% de neutrófilos (2% de cayados) y 13% de linfocitos. El hematocrito era de 44% y no se anotó el recuento de plaquetas. La creatinina era de 1,6 mg/dl, la urea de 188 mg/dl y la glucosa de 52 mg/dl. La impresión clínica era la de un shock hipovolémico con deshidratación grave e insuficiencia renal aguda. Dada la gravedad de su proceso, fue derivada ese mismo día (undécimo después de la vacunación) al Hospital Nacional de Lima.

En el Hospital Nacional de Lima, le encontraron una presión arterial de 80/50 mmHg, una frecuencia cardíaca de 100 y una frecuencia

respiratoria de 30. Los resultados de la exploración fueron similares a los observados en el hospital referente; también se señaló que estaba inquieta, gemía y tenía las pupilas midriáticas. Se le administraron de inmediato líquidos intravenosos que indujeron la diuresis al cabo de una hora. Los resultados de los análisis de laboratorio iniciales en este hospital fueron: hematocrito 31%, leucocitos 11.470/mm³, con 82% de neutrófilos (18% de cayados), plaquetas 24.000/mm³, sodio 121 mmol/l, creatinina 3,2 mg/dl, urea 154 mg/dl, aspartato-aminotransferasa (AST) 735 U/l, alanina-aminotransferasa (ALT) 167 U/l, bilirrubina total 6,3 mg/dl, bilirrubina directa 6,2 mg/dl, albúmina 1,6 g/dl, Cociente Internacional Normalizado (INR) 2,99, creatina cinasa 3.173 U/l, y mioglobina sérica 1.851 ng/ml. Los resultados de la gasometría en sangre arterial fueron: pH 7,095, pCO₂ 34, pO₂ 223 mmHg y bicarbonato 11.

La impresión diagnóstica revisada fue la de un shock distributivo resistente al tratamiento con insuficiencia de sistemas multiorgánica y acidosis metabólica grave, insuficiencia respiratoria aguda, encefalopatía, coagulopatía y hemorragia digestiva alta. Se intubó y se ventiló mecánicamente en la unidad de cuidados intensivos. El tratamiento incluyó líquidos intravenosos, vasopresores, hidrocortisona, meropenam, vancomicina e insulina. A pesar del tratamiento intensivo, su situación clínica se deterioró durante los días siguientes. Presentó ictericia, edemas y fiebre con una temperatura máxima de 40,2°C. Su hematocrito era de 15,5%, las plaquetas 15.000/mm³, la creatinina 1,7 mg/dl, la urea 112 mg/dl y el fibrinógeno 62 mg/dl. Se mantuvo acidémica, con un pH sanguíneo de 7,093 a 7,230. La AST aumentó a 850 U/l y la ALT a 222 U/l. En el coprocultivo creció *E. coli* O86. En un primer hemocultivo se obtuvo *Staphylococcus*, de especie no especificada; que según el informe del laboratorio posiblemente era un contaminante. En otro hemocultivo crecieron levaduras, extraoficialmente informadas luego como correspondientes a *Cándida*.

El tercer día de su hospitalización (el día 14 después de la vacunación), tuvo un paro cardíaco y murió después de los intentos infructuosos de reanimación.

b) Resultados de los análisis serológicos:

Los estudios serológicos realizados en el Instituto Nacional de Salud del Perú no mostraron datos probatorios de infección reciente por VIH, hantavirus, virus de la hepatitis B, leptospirosis, virus Mayaro, virus Oropuche, virus de la encefalomielitosis equina venezolana ni rickettsias.

c) Resultados post mortem (estudio microscópico):

En las muestras tisulares post mortem examinadas en los CDC y el INS del Perú se observó lo siguiente: el hígado mostraba esteatosis microvesicular difusa, escasa necrosis hepatocítica e infiltrados mixtos dispersos de células inflamatorias; el riñón presentaba eritrocitos y cilindros de glóbulos rojos en los túbulos; en el cerebro se observaba edema y gliosis discreta; el pulmón mostraba congestión, inflamación intersticial y edema intraalveolar (estos hallazgos en el pulmón solo fueron observados en los CDC).

En la Morgue Central del Instituto de Medicina Legal, se observó infección por *Cándida* en laringe, epiglotis, tráquea y estómago. También descubrieron una endometritis.

d) Pruebas específicas relacionadas con la vacuna anti-amarilla:

El suero obtenido 11 días después de la vacunación dio un resultado positivo para la IgM contra el virus de la fiebre amarilla (VFA), pero negativo para la IgG anti-VFA, determinada mediante ELISA. La prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) obtuvo un título de anticuerpos anti VFA de 1:10.240

La RT-PCR mostró la presencia de ARN del VFA 17D en suero, orina, hígado, pulmón, riñón y cerebro (INS del Perú, NMRCDC y CDC). No se logró aislar VFA a partir del cultivo de ningún tejido post mortem. En los CDC, se determinó la carga viral mediante PCR en tiempo real. Se detectó ARN del VFA 17D en hígado (1,1 x 10⁴ PFUeq/ml), y cerebro (4,2 x 10³ PFUeq/ml), y se obtuvieron valores de 9,6 x 10², 4,6 x 10², 2,6 x 10² y 2,5 x 10² PFUeq/ml en orina, pulmón, suero y riñón, respectivamente. La carga viral en suero se determinó a partir de una muestra obtenida 11 días después de la vacunación. La secuencia del fragmento sérico obtenido por PCR concordaba con la glucoproteína E del VFA (INS del Perú). La secuencia del fragmento obtenido por PCR en cerebro era 100% idéntica a la cepa de virus 17 DD de la vacuna anti-amarilla en la región E (NMRCDC). La secuenciación del ARN del tejido hepático proporcionó resultados idénticos a los de la cepa de referencia de VFA 17 DD, con la excepción de un cambio nucleotídico silencioso (CDC).

Mediante estudio inmunohistoquímico (IHC), se detectó antígeno del VFA 17D, con escasa tinción en hígado, pulmón, riñón y cerebro (CDC).

Caso 3 (MCP)

a) Resumen clínico:

Este varón de 79 años residente en la Provincia de Nazca (Departamento de Ica), recibió la vacuna antiamarilica correspondiente al lote 050VFA121Z (producida por Bio-Manguinhos en Brasil; con fecha de caducidad en octubre del 2007) mediante inyección subcutánea el 1 de octubre del 2007. Entre sus antecedentes médicos, destacaba hipertrofia prostática benigna que había requerido prostatectomía (2002), gastritis (2006) y alergia a las sulfamidas. La familia informó que durante los dos meses previos a su hospitalización el paciente comenzó a presentar disnea de esfuerzo moderado, que con el tiempo progresó hacia disnea de esfuerzo leve y dolor precordial de esfuerzo. En los registros médicos, no constaba ningún diagnóstico de enfermedad cardíaca. La entrevista con la familia del paciente reveló que esta era su primera dosis de vacuna antiamarilica (no se disponía de ningún registro de salud que lo confirmara). No se conocían antecedentes de medicación habitual ni viajes recientes.

Tres días después de la vacunación, el paciente inició un cuadro de fiebre (no cuantificada), malestar general, disnea e intenso dolor abdominal. Cinco días después de la vacunación, empezó a tener vómitos y diarrea, con cinco a siete deposiciones por día acuosas, sanguinolentas y con moco. Seis días después de la vacunación, lo llevaron al Hospital de Nazca aquejado de fiebre, tos y empeoramiento del dolor abdominal. En la evaluación inicial de sus signos vitales, tenía una presión arterial de 100/60 mmHg, una frecuencia cardíaca de 88/min., una frecuencia respiratoria de 22/min. y una temperatura axilar de 38°C. En la exploración, destacaba la presencia de ligeros estertores y disminución de los ruidos respiratorios en la base derecha del pulmón. Los resultados de las pruebas de laboratorio iniciales fueron: leucocitos 7.200/mm³, con 75% de neutrófilos (10% de bandas); heces mucosas y de color rosado, con más de 100 leucocitos/campo, más de 400 hematíes/campo y 8-16 neutrófilos polimorfonucleares/campo; orina con moderada presencia de bilis, 1-2 leucocitos/campo, 3-4 hematíes/campo y escasas bacterias. No se realizaron determinaciones de bioquímica sérica ni recuento de plaquetas. El diagnóstico a su ingreso fue de bronconeumonía y posible infección de las vías urinarias. Fue tratado con líquidos intravenosos y ceftriaxona.

El estado del paciente se deterioró durante los días siguientes. En el tercer día de su estancia hospitalaria (noveno día después de la vacunación), tenía una presión arterial de 60/20 mmHg y una frecuencia cardíaca de 144/min., y presentaba dolor abdominal y diarrea acuosa. Se le diagnosticó un shock hipovolémico y se trasladó al Hospital Regional de Ica, donde en la exploración inicial destacaba la presencia de taquipnea sin sonidos respiratorios anormales, taquicardia y sonidos peristálticos aumentados. Entre los resultados de laboratorio destacaba: hematocrito 43%, leucocitos 9.400/mm³, con 96% de neutrófilos (13% de cayados); creatinina 2 mg/dl; urea 37 mg/dl. Los diagnósticos de ingreso fueron insuficiencia cardíaca congestiva, bronquitis crónica y diarrea aguda acuosa (posible disentería). Fue tratado con furosemida, captopril, ceftriaxona y amikacina.

Posteriormente, su estado se deterioró aún más, con la aparición de fibrilación auricular con respuesta ventricular rápida, así como de distensión y dolor difuso abdominales. Al día siguiente (décimo después de la vacunación), se intubó y se ventiló mecánicamente, ya que presentaba edema pulmonar, taquipnea y acidemia (pH en sangre 7,05, PCO₂ 34). Los análisis de laboratorio mostraban los siguientes valores: hematocrito 53%, leucocitos 17.400/mm³, plaquetas 249.000/mm³, creatinina 2,8 mg/dl, aspartato aminotransferasa (AST) 416 U/l, alanina aminotransferasa (ALT) 231 U/l, fosfatasas alcalinas 605 U/l, bilirrubina total 2,9 mg/dl, bilirrubina directa 2,3 mg/dl, PSA 76,45 ng/ml. Las pruebas de aglutinación obtuvieron un título de aglutininas de 1/80 para antígeno tífico O y de 1/320 para antígeno tífico H. La ecografía abdominal mostró hepatopatía difusa, esplenomegalia, nefropatía bilateral, íleo y coledocitis. Los diagnósticos revisados fueron los de shock distributivo, probablemente séptico a partir de un foco abdominal; insuficiencia respiratoria aguda, muy probablemente por edema pulmonar; insuficiencia renal aguda; y posible coronariopatía crónica. Se modificó el tratamiento y se le administró dopamina, adrenalina, furosemida, imipenem, hidrocortisona, coloide sintético, así como transfusiones de plaquetas (10 unidades) y plasma fresco congelado (2 unidades).

El cuadro del paciente no respondió al tratamiento y murió el undécimo día después de la vacunación.

b) Resultados de los análisis serológicos:

Los estudios serológicos realizados en el Instituto Nacional de Salud del Perú no detectaron ninguna infección reciente por leptospiras o VIH.

c) Resultados post mortem (estudio microscópico):

El examen post mortem de los tejidos en los CDC mostraba lo siguiente: el hígado presentaba esteatosis micro y macrovesicular difusas, con extensa necrosis hepatocítica multifocal; el bazo mostraba signos de extensa congestión y depleción de la pulpa blanca; en riñones se observó necrosis tubular aguda, con hemorragia intersticial; y en el SNC había congestión. En el informe del INS del Perú, se señalaba que la grave congestión y la hemorragia focal dificultaban la adecuada visualización microscópica de los tejidos

aunque, en términos generales, los resultados histopatológicos eran compatibles con una insuficiencia cardíaca congestiva.

La Morgue Central del Instituto de Medicina Legal notificó cardiopatía crónica, daño hepático compatible con la cardiopatía crónica y un área de necrosis mediozonal en hígado.

d) Pruebas específicas relacionadas con la vacuna anti-amarilla:

El suero obtenido diez días después de la vacunación dio un resultado positivo para la IgM contra el virus de la fiebre amarilla (VFA), pero negativo para la IgG anti-VFA, determinada mediante ELISA. No se realizó la PRNT debido al volumen insuficiente de la muestra.

La RT-PCR mostró la presencia de ARN del VFA 17D en suero, hígado, pulmón, riñón, bazo y cerebro (INS del Perú y CDC). No se pudo aislar el VFA a partir del cultivo de ninguna muestra tisular post mortem. Se determinó la carga viral mediante PCR en tiempo real (CDC). Se detectaron cantidades elevadas de VFA 17D en bazo o hígado¹ ($3,5 \times 10^4$ PFUeq/ml), en riñón ($2,7 \times 10^4$ PFUeq/ml) y en pulmón ($2,1 \times 10^3$ PFUeq/ml), mientras que en cerebro y suero se detectaron $2,6 \times 10^2$ y $1,9 \times 10^2$ PFUeq/ml, respectivamente. La carga viral en suero se determinó a partir de una muestra obtenida diez días después de la vacunación. En los CDC, sólo se pudo amplificar una porción del genoma del VFA mediante RT-PCR y, por consiguiente, sólo se realizó una secuenciación parcial del genoma. En las regiones de las que se obtuvieron datos de la secuencia (2870 bases) correspondiente al VFA amplificado procedente de los tejidos del paciente, la secuencia era idéntica a la del lote de semilla secundaria del virus 17 DD.

Mediante el estudio inmunohistoquímico realizado en los CDC sólo se detectaron escasas cantidades de antígeno del VFA 17D en el bazo.

Caso 4 (MYS)

a) Resumen clínico:

Esta mujer de 49 años residente en la Provincia de Chincha (Departamento de Ica) recibió la vacuna anti-amarilla correspondiente al lote 050VFA121Z (producida por Bio-Manguinhos en Brasil; con fecha de caducidad en octubre del 2007) mediante inyección subcutánea el 24 de septiembre del 2007. Entre sus antecedentes médicos, destacaba el diagnóstico de artritis reumatoide inicial en 1993, lupus eritematoso sistémico (LES) diagnosticado en 1996, insuficiencia renal crónica, hipertensión y un accidente cerebrovascular en el 2003 a consecuencia del cual debía utilizar muletas para desplazarse. Se le había prescrito tratamiento con prednisona dos veces al día (dosis desconocida), captopril a diario (dosis desconocida) e ibuprofeno en caso necesario. Sin embargo, los registros indican que había dejado de tomar estos medicamentos tres años antes. La entrevista con la familia de la paciente reveló que esta era su primera dosis de vacuna anti-amarilla (no se disponía de ningún registro de salud que lo confirmara). No se conocían antecedentes de alergias ni viajes recientes.

Cuatro días después de la vacunación, fue vista en el consultorio de atención ambulatoria del Hospital de Chincha donde acudió aquejada de dolor en la cadera que dificultaba la marcha desde hacía una semana. Le administraron una inyección intramuscular de dexametasona y diclofenaco (dosis desconocida) y también le prescribieron metotrexato oral (16 comprimidos; dosis desconocida) y tenoxicam oral (50 comprimidos; dosis desconocida). Los registros no indican si tomó alguno de estos medicamentos administrables por vía oral. Le dijeron que regresara para su reevaluación al cabo de dos semanas. Siete días después de la vacunación, presentó dolor en las piernas, varios episodios (número desconocido) de melenas y tres episodios de sangrado vaginal. Dieciocho días después de la vacunación, regresó al consultorio de atención ambulatoria del hospital de Chincha, tal como estaba programado, aquejada de intensa cefalea, malestar general y artralgias. Se le prescribió diclofenaco, vitamina B₁₂ y prednisona (vía, dosis y cantidades desconocidas) y se la citó para control al cabo de dos semanas.

Veintinueve días después de la vacunación, acudió al departamento de urgencias con intensa cefalea, diuresis escasa y signos de deshidratación. Estaba afebril, pero presentaba afectación importante del estado general, con edema generalizado, ictericia leve, deshidratación y disminución del nivel de conciencia. Se realizaron análisis básicos de laboratorio con los siguientes resultados: aspartato aminotransferasa (AST) 91 U/l, alanina aminotransferasa (ALT) 128 U/l, fosfatasa alcalina 742 U/l, bilirrubina total 5,2 mg/dl y bilirrubina directa 4,2 mg/dl. No se solicitó un hemograma completo ni otras pruebas de bioquímica sanguínea. Fue evaluada por un gastroenterólogo que le diagnosticó encefalopatía de etiología desconocida, colestasis aguda y "síndrome posvacunación contra la fiebre amarilla" y recomendó su derivación a un hospital de mayor nivel asistencial.

¹ No se sabe con certeza si el tejido congelado recibido y utilizado por los CDC para llevar a cabo la RT-PCR y la PCR en tiempo real correspondía a hígado o bazo.

Al día siguiente (día 30 después de la vacunación), la paciente fue trasladada a un hospital de Lima. A su llegada, tenía una temperatura de 37,2°C, y en la exploración se observó intensa palidez de piel y mucosas, sangrado de mucosas, ictericia escleral, equimosis en extremidades inferiores y taquicardia. Se realizaron las siguientes pruebas de laboratorio: leucocitos 5.530/mm³, hematocrito 31%, plaquetas 57.000/mm³, aspartato aminotransferasa (AST) 100 U/l, bilirrubina total 5,2 mg/dl, creatinina 3,3 mg/dl, urea 272 mg/dl, sodio 123 mmol/l, potasio 6,8 mmol/l y lactato 4,4 mmol/l. La ecografía abdominal mostró hepatopatía crónica, esplenomegalia y aumento de la ecogenicidad renal bilateral. Se diagnosticó de encefalopatía metabólica, acidosis metabólica, posible septicemia, insuficiencia renal crónica descompensada, ictericia probablemente secundaria a hepatopatía aguda, exacerbación del LES y "síntomas agudos de fiebre amarilla vacunal". Fue tratada con ceftazidima intravenosa, hidrocortisona y líquidos. Presentó un paro respiratorio con bradicardia y fue intubada y ventilada mecánicamente. Posteriormente, tuvo una crisis convulsiva generalizada y otro paro cardiopulmonar, que no respondió a las maniobras de reanimación. Murió el día 30 después de la vacunación.

b) Resultados de los análisis serológicos:

Las pruebas serológicas realizadas en el Instituto Nacional de Salud del Perú no detectaron la presencia de infección por VIH ni leptospiras.

c) Resultados post mortem (estudio microscópico):

El examen tisular post mortem mostró lo siguiente: el hígado presentaba esteatosis microvesicular difusa y necrosis hepatocelular diseminada (CDC y INS del Perú), así como áreas diferenciadas de infiltrados mixtos de células inflamatorias (INS del Perú); en el riñón se observaban infiltrados mononucleares intersticiales (CDC) y glomerulonefritis membranoproliferativa con necrosis tubular aguda (INS del Perú); el pulmón mostraba edema pulmonar (INS del Perú); en el cerebro no aparecían cambios histopatológicos significativos (CDC).

La tinción de Gram tisular (CDC) reveló abundantes microorganismos grampositivos y gramnegativos en pulmón, hígado y riñón. Dado que muchos de estos organismos aparecían en forma de conglomerados, sin la reacción inflamatoria correspondiente, el anatómopatólogo examinador consideró que muy probablemente representaban una proliferación polimicrobiana post mortem.

La Morgue Central del Instituto de Medicina Legal descubrió lesiones en diferentes órganos compatibles con LES, especialmente en los riñones. El daño hepático era compatible con fiebre amarilla: áreas de necrosis mediozonales.

d) Pruebas específicas relacionadas con la vacuna antiamarílica:

El suero del paciente dio un resultado positivo para la IgM contra el virus de la fiebre amarilla (VFA), pero negativo para la IgG anti-VFA, determinada mediante ELISA. La prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) obtuvo un título de anticuerpos anti VFA superior a 1:20.480 (CDC).

La RT-PCR mostró la presencia de ARN del VFA 17D en suero (INS del Perú), hígado (CDC) y riñón (INS del Perú y CDC). Los intentos de aislamiento del virus de la fiebre amarilla mediante cultivo de todos los tejidos fueron infructuosos (INS del Perú). Se determinó la carga viral mediante PCR en tiempo real (CDC). La carga viral de VFA 17D en riñón fue de 1×10^4 PFUeq/ml y en hígado de 3-5 PFUeq/ml. No se obtuvieron cantidades suficientes de ARN a partir de los tejidos como para realizar el análisis de secuencias.

Mediante tinción inmunohistoquímica (IHC), se detectó antígeno de VFA 17D en hígado (INS del Perú) y riñón (CDC).

Anexo 2

Posible enfermedad viscerotrópica no fatal asociada a la vacuna antiamarílica

Posible enfermedad viscerotrópica no fatal asociada a la vacuna antiamarílica

Motivo principal de consulta: JDC, un varón de 43 años, fue ingresado en el Hospital III Félix Torrealva Gutiérrez de Ica, el 4 de octubre del 2007, por presentar fiebre de 38-39°C, malestar general y cefalea desde hacía siete días.

Enfermedad actual: El paciente es un varón de 43 años, residente en el Distrito de Pachacutec del Departamento de Ica, con buena salud hasta el 27 de septiembre, siete días antes de su ingreso, cuando inició un cuadro de fiebre, cefalea y malestar general. Cuatro días antes de su ingreso, el paciente empezó a tener diarrea y fue visitado en un consultorio local. Le practicaron un análisis de orina que fue normal y se inició tratamiento con amoxicilina. Debido a la persistencia de la fiebre, la cefalea y la diarrea, el paciente acudió al servicio de urgencias del Hospital III, el día 4 de octubre.

Antecedentes de vacunación: Según el formulario de investigación de eventos supuestamente atribuibles a vacunación o inmunización (ESAVI), el paciente fue vacunado el 23 de septiembre del 2007 en el Centro de Salud de Pachacutec como parte de una campaña de vacunación. Según el registro de vacunación, "carnet," al paciente se le administró la vacuna Td. El paciente asegura que en esa fecha le administraron la vacuna antiamarílica (en el registro del hospital no consta la administración de esta vacuna).

Antecedentes de viajes: Ninguno

Antecedentes ocupacionales: Profesor o maestro (docente)

Alcohol: Consume alcohol una vez a la semana

Antecedentes médicos:

- Apendicectomía en febrero del 2007
- Fractura de tibia a los 9 años
- Ninguna enfermedad crónica

Signos vitales: En el Servicio de Urgencias, el paciente tenía una temperatura de 39°C. Cuando ingresó, la temperatura era de 37,5°C, la frecuencia cardíaca de 84/min., la frecuencia respiratoria de 24/min. y estaba normotenso.

Exploración física: El paciente pesaba 77 kilogramos, y estaba consciente y orientado. Sólo destacaba la presencia de diaforesis y congestión faríngea. El abdomen no era doloroso y el paciente no presentaba meningismo ni signos neurológicos focales.

Resultados de laboratorio: Hemoglobina 15,7, hematocrito 44,4%, plaquetas 267.000, leucocitos 9.680 (67% de neutrófilos, 25% de linfocitos), creatinina 0,6, aspartato aminotransferase (AST) 158 (2-35), alanina aminotransferase (ALT) 244 (9-43).

Diagnóstico inicial: Síndrome febril de origen indeterminado (no se dispuso inicialmente de los valores de las enzimas hepáticas). Una nota del servicio de urgencias sugiere descartar los diagnósticos de infección de las vías urinarias, nefrolitiasis, fiebre tifoidea y reacción posvacunal.

Curso clínico: El paciente ingresó en el servicio de Medicina Interna y se planificó cultivar orina, realizar aglutininas febriles, hidratar con líquidos intravenosos y administrar paracetamol para controlar la fiebre. Le administraron metamizol IM.

El paciente siguió teniendo fiebre y cefalea. En 7 de octubre, el paciente fue trasladado a la unidad de cuidados intensivos para la ampliación del estudio diagnóstico y la "observación neurológica". En ese momento, se consideró que el paciente estaba levemente deshidratado y presentaba una leve ictericia escleral. Por lo demás, la exploración física no detectó nada particular. El paciente siguió recibiendo líquidos intravenosos. También le administraron oxígeno, logrando una saturación excelente, y sucralfato. Como diagnóstico en la UCI se debía descartar una encefalitis posvacunal. Los resultados de los nuevos análisis de laboratorio practicados el día 8 de octubre fueron aspartato aminotransferase (AST) 19, alanina aminotransferase (ALT) 28, bilirrubina total 0,5, proteínas totales 8,2, y pruebas de coagulación normales. El día 8 de octubre, cedió la fiebre del paciente.

El día 9 de octubre, el paciente fue valorado por un consultor infectólogo y fue trasladado desde la unidad de cuidados intensivos al servicio de enfermedades infecciosas. El infectólogo consideró que el paciente probablemente presentaba una reacción a la vacuna Td.

El urocultivo fue negativo, las aglutininas febriles fueron negativas (antígeno H 1:80) y el estudio de parásitos en heces fue también negativo. La ecografía hepática realizada el 3 de octubre (?) mostraba un aumento difuso de la ecogenicidad compatible con una hepatopatía crónica (?). Se obtuvieron muestras de suero y orina del paciente los días 6 y 9 de octubre por parte de Epidemiología; no se sabe con certeza dónde se analizaron estas muestras ni para qué.

El 11 de octubre, el paciente fue dado de alta del hospital con mejoría clínica y con el diagnóstico de complicaciones de la vacunación Td e infección intestinal en proceso de mejoría.

Anexo 3

Protocolo para la Investigación de ESAVI de fiebre amarilla

Ica, Perú, 2007



Ministerio de Salud
Dirección General de Epidemiología

Redacción:

Alvaro Whitttembury Vlásica
Médico Epidemiólogo de la Oficina General de Epidemiología.

Washington Toledo
Médico Consultor OPS-Perú.

María Ticona Zegarra
Enfermera Epidemióloga de la Oficina General de Epidemiología.

Jorge Uchuya Gómez
Médico Epidemiólogo de la Oficina General de Epidemiología.

Víctor Aquije Méndez
Médico Epidemiólogo de la Dirección Regional de Epidemiología de Ica.

Revisión:

Ned Hayes
CDC Atlanta.

Steve Waterman
CDC Atlanta.

Mark Gershman
CDC Atlanta.

Gladys Ramírez Prada
Directora General de la Dirección General de Epidemiología.

José Bolarte Espinoza
Director Sectorial de Vigilancia en Salud Pública.

Protocolo para la investigación de ESAVI de fiebre amarilla Ica, Perú, 2007

1. Introducción

La vigilancia epidemiológica es un proceso continuo y periódico que nos permite conocer la magnitud del problema, identificar poblaciones vulnerables, estratificar el riesgo y evaluar el impacto de las medidas de prevención y control que se están tomando.

La vigilancia epidemiológica de los eventos supuestamente atribuibles a la vacunación o inmunización (ESAVI) se realiza oficialmente en el país desde el año 2002. Para ello, cuenta con la normatividad correspondiente y el documento técnico "Como enfrentar los eventos adversos supuestamente atribuibles a la vacunación o inmunización", en el que se define al ESAVI severo como una enfermedad posterior a vacunación que requiere hospitalización o que ocasiona la muerte. Este sistema tiene cuatro líneas de acción: a) comunicacional, para enfrentar adecuada y oportunamente las "crisis" que se pudiera desencadenar, orientado fundamentalmente a evitar la pérdida de confianza de la población a la vacunación; b) educativo, a través de una adecuada consejería, dirigido a padres y madres de familia para detectar tempranamente en el hogar los signos de alarma posterior a la vacunación y buscar atención médica inmediata (como llanto persistente, fiebre elevada que no cede, convulsiones); c) vigilancia epidemiológica basada en la notificación e investigación inmediata de los casos de ESAVI; y d) el manejo clínico adecuado de los eventos que se presenten. Se han establecido normas, protocolos de investigación, formularios y flujos para la notificación.

Mediante la vigilancia epidemiológica de ESAVI, realizada por la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud, entre el año 2002 hasta el año 2006 el número de ESAVI relacionados a vacunas han sido 13⁽¹⁾. Ver cuadro siguiente.

Cuadro 1. Dirección General de Epidemiología: Número de ESAVI graves registrados en el subsistema de vigilancia epidemiológica de los ESAVI, Perú, 2001-2006

Vacunas y ESAVI severos													
Años	BCG	HVB	VOP	DTP	Pentavalente	Hib	Antiamarílica	DT pediátrico	DT Adulto	Anti-sarampionosa	SRP triple viral	SR doble viral	Subtotal
2001	0	0	0	0	n/a	n/a	0	0	0	0	n/a	n/a	0
2002	0	0	0	(2) choque anafiláctico (2) síndrome convulsivo febril (1) reacción vacunal (llanto)	n/a	n/a	0	0	0	0	n/a	n/a	5
2003	0	0	0	0	(1) choque anafiláctico (1) síndrome convulsivo febril	0	0	0	0	0	0		2
2004	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(2) púrpura trombocitopénica	2
2005	0	0	0	0	0	0	(1) encefalitis	0	0	0	0	(2) púrpura trombocitopénica	3
2006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(1) choque anafiláctico	1
Total	0	0	0	5	2	0	1	0	0	0	0	5	13

n/a: no aplica

1.1 Planteamiento del problema de investigación:

Desde el 23 de septiembre al 6 de octubre del presente año, la Estrategia Sanitaria Nacional de Inmunizaciones llevó a cabo la vacunación contra la fiebre amarilla en la población de 15 a 59 años de la Región de Ica. Se vacunaron un total de 63.174 personas, de los cuales 42.742 personas fueron vacunadas con el lote 050VFA121Z y 23.172 con el lote 050VFA123Z. Entre el 6 y el 4 de noviembre de 2007, se notificó mediante el sistema de vigilancia de ESAVI el fallecimiento de 4 personas cuyas edades variaban entre 23 y 79 años. Todas estas muertes ocurrieron posteriormente a la vacunación antiamarílica (sub-cepa 17DD, fabricada por Bio-Manguinhos, Brasil) con el lote 050VFA121Z. Además, el día 31 de octubre del 2007 se notificó un caso más de ESAVI por vacunación antiamarílica que terminó con el fallecimiento de la paciente. Esta paciente fue vacunada en Lima con el lote 064VFA035Z.

Los cuatro primeros casos presentaron un cuadro clínico similar caracterizado por fiebre, cefalea, malestar general y diarrea acuosa, progresando rápidamente hacia el shock distributivo e insuficiencia multiorgánica irreversible. El inicio de los síntomas se dio dentro de las 24 horas hasta 1 semana después de la vacunación. El quinto caso tiene un diagnóstico de anemia hemolítica autoinmune. Basados en la información clínica y de laboratorio disponible hasta la fecha, y siguiendo los criterios de clasificación propuestos por la OMS,⁽²⁾ cuatro de los cinco casos han sido clasificados como casos de enfermedad viscerotrópica aguda post vacunación antiamarílica; el cuarto y quinto casos todavía tienen pendiente estudios de laboratorio.⁽³⁾

La enfermedad viscerotrópica aguda posterior a la vacunación contra la fiebre amarilla es una condición rara vez notificada y fue inicialmente reconocida en 2001. A la fecha se han reportado 37 casos sospechosos o confirmados a nivel mundial después de la vacunación con sub-cepas vacunales 17DD y 17D204. Esta condición se presenta habitualmente como una enfermedad similar a la fiebre amarilla con insuficiencia multiorgánica, cuyos síntomas aparecen 2-5 días después de recibir la vacuna antiamarilica. El riesgo calculado para la enfermedad viscerotrópica post vacunación antiamarilica es de 0,1 a 0,3 por 100.000 personas vacunadas en total; un riesgo mayor ha sido documentado para personas mayores de 60 años. En la actualidad poco se sabe sobre los factores del huésped o factores de la vacuna que potencialmente contribuyen al riesgo de contraer enfermedad viscerotrópica.

Los casos reportados constituyen el primer conglomerado notificado de casos de enfermedad viscerotrópica vinculados a un único lote de vacuna. Con base en el número de dosis del lote de vacuna aplicadas en Ica desde el 23 de septiembre hasta el 6 de octubre, la tasa de casos reportada es de aproximadamente 10 por 10.000 dosis, la cual es significativamente más alta que las tasas reportadas previamente.^(4,5,6)

En vista de la alta tasa reportada de casos de enfermedad viscerotrópica, relacionada al lote de vacuna 05OVFA121Z usado en Perú, la OPS/OMS recomendó, de inmediato, la suspensión de uso del lote de la vacuna antiamarilica de Bio-Manguinhos 05OVFA121Z y lotes relacionados durante el proceso de producción, específicamente 05OVFA118Z, 05OVFA119Z, 05OVFA120Z, 05OVFA122Z, 05OVFA123Z, 05OVFA124Z, 05OVFA125Z, 05OVFA126Z, 064VFA035Z.

Ante esta situación, desde la perspectiva epidemiológica se planteó desarrollar una investigación buscando casos o defunciones que cumplan con la definición de enfermedad viscerotrópica y enfermedad neurotrópica que no hubieran sido captados por la vigilancia regular de ESAVI. Para ello se plantearon dos estrategias:

- Búsqueda retrospectiva de casos que cumplan con la definición de enfermedad viscerotrópica en los registros de atención de los hospitales de la Región Ica, tanto en hospitalización como en emergencia. Se buscará su asociación a vacunación antiamarilica, y se hará la descripción clínica, epidemiológica y se buscará de factores de riesgo.
- Búsqueda retrospectiva de fallecidos en los registros civiles municipales, identificación de los que cumplen con la definición de enfermedad viscerotrópica a través de la revisión de historias clínicas y/o entrevista a personal de salud y familiares, buscar su asociación a vacunación antiamarilica, para su descripción clínica, epidemiológica y de laboratorio, así como para la identificación de factores de riesgo (anexo 1).

Una tercera estrategia incluía la captación de casos incidentes en hospitales seleccionados del país que cumplan con la definición de caso de enfermedad viscerotrópica, buscar su asociación a vacunación antiamarilica, para su descripción clínica, epidemiológica y de laboratorio, así como para la identificación de factores de riesgo; sin embargo no se pudo desarrollar esta actividad.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

- Identificar y describir casos probables de enfermedad viscerotrópica y enfermedad neurotrópica asociados a la vacunación antiamarilica.
- Determinar cuáles son los factores de riesgo relacionados a la enfermedad viscerotrópica asociada a la vacunación antiamarilica.

2.2 Objetivos específicos:

- Evaluar la definición de caso para enfermedad viscerotrópica y neurotrópica asociada a la vacunación antiamarilica.
- Identificar casos probables de enfermedad viscerotrópica y neurotrópica asociada a la vacunación antiamarilica en hospitales del Ministerio de Salud (MINSa) y otras instituciones, seleccionados de la Dirección Regional de Salud (DIRESA) Ica.
- Identificar casos probables de enfermedad viscerotrópica asociada a la vacunación antiamarilica en los registros de defunción de la DIRESA Ica.
- Realizar la descripción clínica, epidemiológica y de laboratorio de los casos probables de enfermedad viscerotrópica en población vacunada contra la fiebre amarilla durante el año 2007, en hospitales del MINSa y otras instituciones seleccionados de la DIRESA Ica.
- Identificar factores de riesgo relacionados a la enfermedad viscerotrópica asociada a la vacunación antiamarilica.

3. Población y muestra

3.1 Tipo de muestra:

El estudio se desarrolló mediante la búsqueda retrospectiva de pacientes internados en los hospitales y que cumplieran los criterios de selección (ver 3.5.1). Una vez seleccionados se procedió a buscar en la historia clínica si cumplen con las definiciones de caso probable y definitivo de enfermedad viscerotrópica y neurotrópica asociada a la vacunación antiamarílica.

3.2 Población:

La población de estudio estuvo constituida por los usuarios de los servicios de salud de los hospitales del MINSA, EsSalud, Fuerza Armadas y Policiales de la DIRESA Ica, atendidos entre el 23 de septiembre y el 6 de noviembre del 2007.

3.3 Criterios de inclusión y exclusión:

3.3.1 Criterios de inclusión:

- *Caso* es todo aquel paciente que cumple con los *criterios de selección* (ver 3.5.1).
- *Control* será todo aquel paciente que haya sido atendido en el mismo día, en el mismo hospital, que tenga el mismo sexo, la misma edad (+/- 2 años) y que no cumpla con los criterios de selección (ver 3.5.1). De preferencia se seleccionará a aquel paciente que haya sido atendido correlativamente antes o después de un caso por el mismo médico.

3.3.2 Criterios de exclusión:

- Se incluyeron todos los pacientes que cumplieron con los criterios de selección.

3.4 Muestra:

3.4.1 Cálculo del tamaño de la muestra:

Se tomarán todos los pacientes que cumplan con los *criterios de selección* (3.5.1) y que hallan sido atendidas en hospitales de la región entre el 23 de septiembre y el 6 de noviembre del 2007.

3.4.2 Selección de la muestra:

No se realizó muestreo. Se trabajó con toda la población objetivo.

3.5 Definición operacional de variables:

3.5.1 Criterios de selección:

Todo paciente que presente fiebre mayor de 38°C (o sensación de alza térmica) de más de 24 horas de duración y **uno o más** de los siguientes signos y síntomas:

1. Cefalea intensa.
2. Alteración del sensorio.
3. Convulsiones tónico-clónicas.
4. Náuseas – vómitos.
5. Deposiciones líquidas.
6. Mialgias de más de 24 horas de duración.
7. Artralgias de más de 24 horas de duración.
8. Frecuencia respiratoria incrementada (>20 respiraciones por minuto).

3.5.2 Definición de caso probable de enfermedad viscerotrópica asociada a la vacunación antiamarílica:

Todo caso que haya sido vacunado hasta 15 días antes del inicio de la sintomatología, sin evidencia de otras etiologías que expliquen el cuadro clínico, que tenga fiebre y uno o más de los siguientes: náuseas, vómitos, malestar general, deposiciones líquidas, mialgias, artralgias, disnea; y uno o más de los siguientes:

- Transaminasas séricas elevadas por lo menos 3 veces por encima de lo normal.

- Bilirrubina sérica total elevada por lo menos 1,5 veces por encima de lo normal.
- Creatinina sérica por lo menos 1,5 veces por encima de lo normal.
- CPK total mayor de 5 veces de lo normal.
- Trombocitopenia (Plaquetas <100,000/ml).
- Miocarditis (anormalidades compatibles incluidas: electrocardiograma, ecocardiograma o cambios enzimáticos cardíacos o inflamación por biopsia de tejido cardíaco).
- Elevación de tiempo de protrombina (INR) o tiempo parcial de tromboplastina activado.
- Histopatología compatible con fiebre amarilla (por ejemplo, necrosis mediozonal de hígado, cuerpos de Councilman).

3.5.3 Definición de caso definitivo de enfermedad viscerotrópica asociada a la vacunación antiamarílica:

Es todo caso probable que tenga uno o más de los siguientes:

- Aislamiento en sangre de virus 17D* de fiebre amarilla luego de pasados 7 días de la vacunación, y/o PCR luego de los 11 días de vacunación.
- La concentración vírica de virus de fiebre amarilla 17D* en el suero, obtenida en cualquier día excede 10^3 pfu/ml.
- Antígeno específico para fiebre amarilla en tejido visceral, demostrado por inmunohistoquímica (IHC).
- Aislamiento del virus de fiebre amarilla 17D* en tejido visceral.
- “Amplificación” del virus de la fiebre amarilla 17D* en tejido visceral.

3.5.4 Definición de caso probable de enfermedad neurotrópica asociada a la vacunación antiamarílica:

Todo caso que haya sido vacunado hasta 30 días antes del inicio de la sintomatología, sin evidencia de otras etiologías que expliquen el cuadro clínico y que tenga fiebre, cefalea intensa y síntomas neurológicos focalizados o generalizados, o cualquiera de los siguientes criterios:

- LCR con signos de infección viral (pleocitosis a predominio MN).
- Resonancia magnética con signos de desmielinización multifocal.
- Alteración del electroencefalograma consistente con encefalopatía.
- Electromiografía con signos de desmielinización.

3.5.5 Definición de caso definitivo de enfermedad neurotrópica asociada a la vacunación antiamarílica:

Todo caso probable:

- Aislamiento en sangre de virus 17D* de fiebre amarilla luego de pasados 7 días de la vacunación, y/o PCR luego de los 11 días de vacunación.
- La concentración vírica de virus de fiebre amarilla 17D* en el suero, obtenida en cualquier día excede 10^3 pfu/ml.
- Antígeno específico para fiebre amarilla en tejido neurológico o LCR, demostrado por inmunohistoquímica (IHC).
- Aislamiento del virus de fiebre amarilla 17D* en tejido neurológico o LCR.
- PCR positivo para el virus de la fiebre amarilla 17D* en tejido neurológico o LCR.
- Detección de IgM para fiebre amarilla en LCR.

4. Procedimientos

La captación de los casos en el estudio se realizó mediante búsqueda activa institucional de egresos hospitalarios (emergencia, hos-

* Virus confirmado como 17D mediante análisis de anticuerpos monoclonales o secuenciación de nucleótidos, donde la posibilidad de infección por fiebre amarilla de tipo salvaje existe, inclusive de todas las vacunas derivadas 17-D.

pitalización, referencias) y búsqueda de registros de defunción en las municipalidades (ver mapa conceptual – fluxograma 1 en la página 39).

4.1 Búsqueda activa institucional:

1. La búsqueda activa de casos de enfermedad viscerotrópica y neurotrópica se realizó en los hospitales seleccionados a través de la revisión de los registros de las atenciones producidas entre la fecha de inicio de la campaña de vacunación antiamarilica y los 30 días siguientes a la finalización de la misma. Para esto se realizaron dos actividades:
 - La relación de pacientes atendidos se obtuvo la base de datos (estadística) con los egresos producidos entre el 23 de septiembre y el 6 de noviembre del 2007, así como de los registros de atención de estos servicios.
 - Se ubicaron las historias clínicas de todos los pacientes atendidos por emergencia y hospitalización en esas fechas, así como de los pacientes transferidos a establecimientos de mayor complejidad.
2. Luego se procedió a seleccionar aquellos pacientes cuyo cuadro clínico cumplía con los criterios de selección (ver ítem 3.5.1). Para ello se revisaron las historias clínicas de cada uno de ellos y llenó la ficha de selección de casos.
3. Si el paciente cumplía los criterios de selección, se procedió a llenar la ficha de investigación y se consiguió una fotocopia de la historia clínica completa de cada caso. Asimismo, se buscó dos controles para cada caso y se obtuvo copias de las historias clínicas (ver 3.3.1).
4. Todas fichas e historias de los pacientes que cumplían con los criterios de selección se enviaron a la Dirección General de Epidemiología en Lima para su revisión y determinar si se cumplía con los criterios de definición de caso probable o definitivo, tanto de enfermedad viscerotrópica como neurotrópica (ver ítem 3.5.2 – 3.5.5).
5. Luego se corroboró el antecedente de vacunación antiamarilica, para lo cual previamente, la Estrategia Sanitaria de Inmunizaciones se encargó de elaborar una base de datos con la información de las personas vacunadas en Ica contra la fiebre amarilla durante la campaña.

4.2 Búsqueda de casos en registros de defunciones:

1. Se realizó mediante la revisión de los registros de defunciones de los municipios. Se incluyeron en la investigación aquellas personas que fallecieron entre el 23 de septiembre y el 6 de noviembre del 2007.
2. Para esto, en los municipios provinciales se revisó el libro de registro de partidas de defunción y certificados de defunción que se tiene en la oficina de registros vitales.
3. Si el paciente había fallecido en un hospital o establecimiento de salud se procedió a buscar la historia clínica. De lo contrario se realizó la autopsia verbal del paciente, para lo cual se visitó al médico que llenó el certificado de defunción y a la familia del fallecido. Asimismo, se procedió a corroborar el dato de vacunación contra la fiebre amarilla.
4. Finalmente se verificará si el paciente cumplió con las definiciones de caso planteadas para el presente estudio.

5. Resultados

El día 13 de noviembre del 2007 se realizó una reunión con las autoridades regionales de salud Ica y con los directores de los establecimientos de salud seleccionados para este trabajo. Se conformaron cinco grupos de trabajo, uno para cada provincia de la Región de Ica: Chincha, Ica, Nazca, Palpa y Pisco. Participaron personal de la Dirección General de Epidemiología, personal de epidemiología del nivel regional y local, personal de EsSalud, del NMRCDC, con apoyo de una persona de la OPS y una persona de los CDC de los Estados Unidos. Cuatro de los equipos trabajaron en la recolección de la información del 13 al 16 de noviembre. Solo el equipo correspondiente a la provincia de Pisco trabajó del 20 al 23 de noviembre.

Los resultados de la búsqueda se muestran en los cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Registros revisados por Provincia y Hospital, Ica, Perú, 2007					
Provincia/Hospital		Hospitalización	Emergencia	Transferencia	Total
Chincha	Hospital San José	130	3330	18	3478
	Hospital EsSalud RTG	347	5864	214	6425
	Policlínico Policía	-	329	-	329
	Defunciones				55
	Total	477	9523	232	10287
Ica	Hospital Regional	227	5200	26	5453
	Hospital Socorro	40	3234	3	3277
	Hospital EsSalud FT	433	556	14	1003
	Defunciones				103
	Total	700	8990	43	9836
Nazca	Hospital de Apoyo Nazca	1164	3686	125	4975
	Defunciones				8
	Total	1164	3686	-	4983
Palpa	Hospital de Apoyo Palpa	24	455	-	479
	Defunciones				1
	Total	24	455	-	480
Pisco	Hospital San Juan de Dios	389	2435	42	2866
	Policlínico EsSalud	123	-	84	207
	Hospital Cubano 1	155	-	-	155
	Hospital Cubano 2	118	-	-	118
	Defunciones				66
	Total	785	2435	126	3412

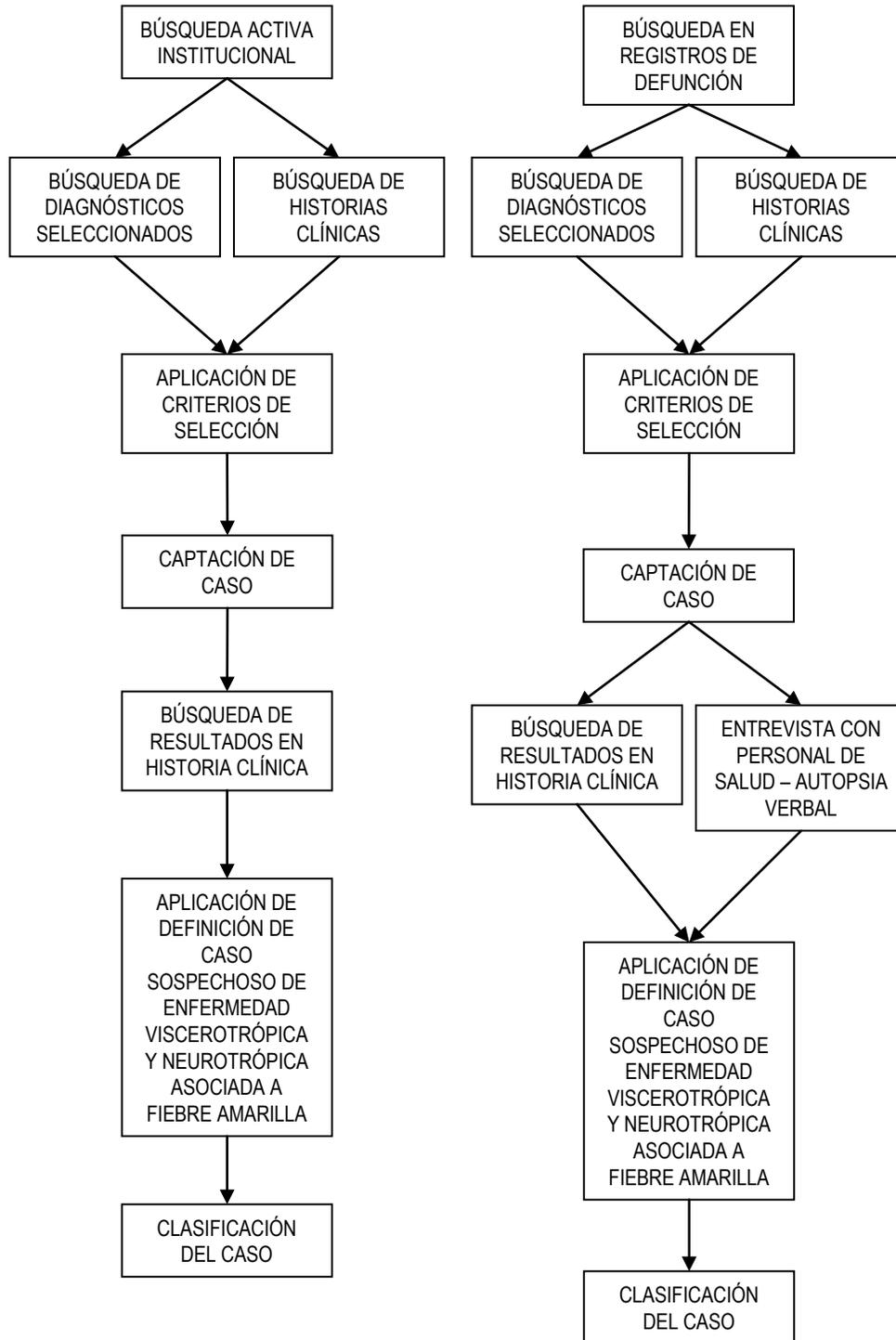
Cuadro 3. Registros hospitalarios revisados y casos identificados, Ica, Perú, 2007					
Provincia	Chincha	Ica	Nazca	Palpa	Pisco
Total	10232	9710	5020	480	3346
Sospechosos	180	33	45	3	50
Probables	3	2	0	0	0
Confirmados	2	2	0	0	0

En total se revisaron 28.788 registros de atención médica en hospitales de las 5 provincias de Ica. Se identificaron 311 casos que cumplían criterios de selección, de los cuales 5 cumplieron criterios de caso probable. Cuatro (4) de estos cinco casos fueron captados por la vigilancia de ESAVI, todos los cuales finalmente han sido relacionados a la vacuna anti amarilica. En relación al quinto caso, no lo encontró en la relación de personas vacunadas. Se trata de una niña de 10 años procedente de la provincia de Chincha y que acude al hospital San José de Chincha por un cuadro caracterizado por ictericia generalizada, tos seca, alza térmica y vómitos. Ingresó con diagnóstico probable de hepatitis viral y faringitis. Los exámenes de laboratorio mostraron aumento de bilirrubinas (BT: 5,14 mg/dl, BD: 0,59 mg/dl, BI: 4,55 mg/dl) a predominio indirecto y anemia (9,8 g/dl). Las transaminasas estaban dentro de límites normales, así como el perfil de coagulación. Las pruebas para hepatitis A, B y C tuvieron resultados negativos.

6. Conclusión

La búsqueda de casos sólo ha permitido identificar los casos que han sido previamente captados por el sistema de vigilancia epidemiológica de ESAVI. No se han identificado otros casos probables ni definitivos de enfermedad viscerotrópica-neurotrópica consecutiva a vacunación anti amarilica en la población de la región de Ica que ha acudido a control médico en los hospitales de dicha región.

FLUJOGRAMA 1: MAPA CONCEPTUAL DEL ESTUDIO



Bibliografía

1. Ministerio de Salud, Dirección General de Epidemiología, Dirección Ejecutiva de Vigilancia Epidemiológica. NOTI 99 [Base de datos electrónica actualizada semanalmente]. Lima: Ministerio de Salud, 2007.
2. Case definitions. Yellow fever vaccine-associated adverse events. 2004.
3. Ministerio de Salud, Dirección General de Epidemiología, Instituto Nacional de Salud, Dirección General de Salud de las Personas, Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas.
4. CDC. Yellow fever vaccine recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2002;51(RR17):1-10.
5. Vellozzi C, Mitchell T, Miller E, Casey C, Eidex R, Hayes E, Yellow fever vaccine safety working group. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease (YEL-AVD) and corticosteroid therapy: eleven United States cases, 1996-2004. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75(2):333-6.
6. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela.

Anexo 4

Informe del Subcomité de Virología encargado de investigar los ESAVI en el Departamento de Ica (Perú), septiembre y octubre del 2007

Alan D.T. Barrett
División Médica de la Universidad de Texas, Galveston (Estados Unidos)

Gwong-Jen J. Chang
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Fort Collins (Estados Unidos)

Ricardo Galler
Fiocruz (Brasil)

Robert S. Lanciotti
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Fort Collins (Estados Unidos)

Thomas P. Monath
Kleiner Perkins Caufield y Byers, Harvard (Estados Unidos)

Informe del Subcomité de Virología encargado de investigar los ESAVI en el Departamento de Ica (Perú), septiembre y octubre del 2007

Resumen

En octubre del 2007, murieron cuatro personas en el Departamento de Ica del Perú posteriormente a la administración del lote 050-VFA-121Z de la vacuna 17DD fabricada por Bio-Manguinhos. Aunque no se secuenció el virus del lote 05-VFA-121Z de la vacuna, las secuencias genómicas de los virus aislados en los casos 1 y 2 fueron indistinguibles de la secuencia de la semilla secundaria 102/84 publicada por Galler y cols.: *Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. Virology. 2001 Nov 25;290(2):309-19*. Conjuntamente con los datos de la secuencia genómica parcial del caso 3, no hay indicios que sugieran que un virus variante del lote 05-VFA-121Z, o potenciado en los pacientes, fuera responsable de las defunciones posteriores a la vacunación. Los estudios revelaron una amplia distribución tisular del virus (incluidos muchos órganos vitales) en las personas vacunadas que fallecieron, así como una viremia alta y una elevada carga viral (en el pulmón del caso 1), todo ello compatible con los informes anteriores de casos que habían fallecido tras ser vacunados contra la fiebre amarilla. Los estudios sobre la estabilidad del lote 05-VFA-121Z indicaron que no se había producido ninguna pérdida significativa en la viabilidad del virus incluso cuando la vacuna estaba próxima a su fecha de caducidad (octubre del 2007) y había sido transportada en múltiples ocasiones entre países. Se pudo verificar la heterogeneidad de la población de ARN del virus de la vacuna en cada uno de los tres lotes de vacuna 17DD. La importancia de estos datos es difícil de evaluar, pero los estudios anteriores ya habían mostrado la heterogeneidad de las poblaciones de virus en las vacunas antiamarílicas 17D-204 y 17DD, y no existían indicios de que ningún virus específico entre la población de la vacuna se hubiera potenciado en las personas vacunadas. En términos generales, los resultados de los estudios realizados hasta la fecha indican que se mantuvo la cadena de frío durante la manipulación del lote 05-VFA-121Z y que este lote contenía vacuna 17DD indistinguible de la vacuna 17DD de otros lotes utilizados desde 1984. Por último, no se produjo una aparente selección de una variante en las personas vacunadas que murieron después de la vacunación con este lote. En resumen, dentro de los límites de las pruebas realizadas, no existen indicios de un cambio en el virus de la vacuna que pudiera explicar los ESAVI.

No obstante, se reconoce el carácter inexplicable de la asociación de cuatro casos fatales con un lote de vacuna (05-VFA-121Z) mientras que no se detectó ningún otro caso entre las personas vacunadas con otro lote utilizado simultáneamente en Ica. El lote de vacuna implicado (050VFA121Z) se administró a unas 42.742 personas. Otras 20.432 personas se vacunaron con un lote diferente (050VFA123Z) y no se notificaron defunciones en este grupo. La incidencia de YEL-AVD asociada con el lote 121Z no es estadísticamente significativa en comparación con la del otro lote ($p=0,2095$, prueba exacta de Fisher, unidireccional) y, por consiguiente, es probable que la asociación con un lote específico ocurriera por casualidad.

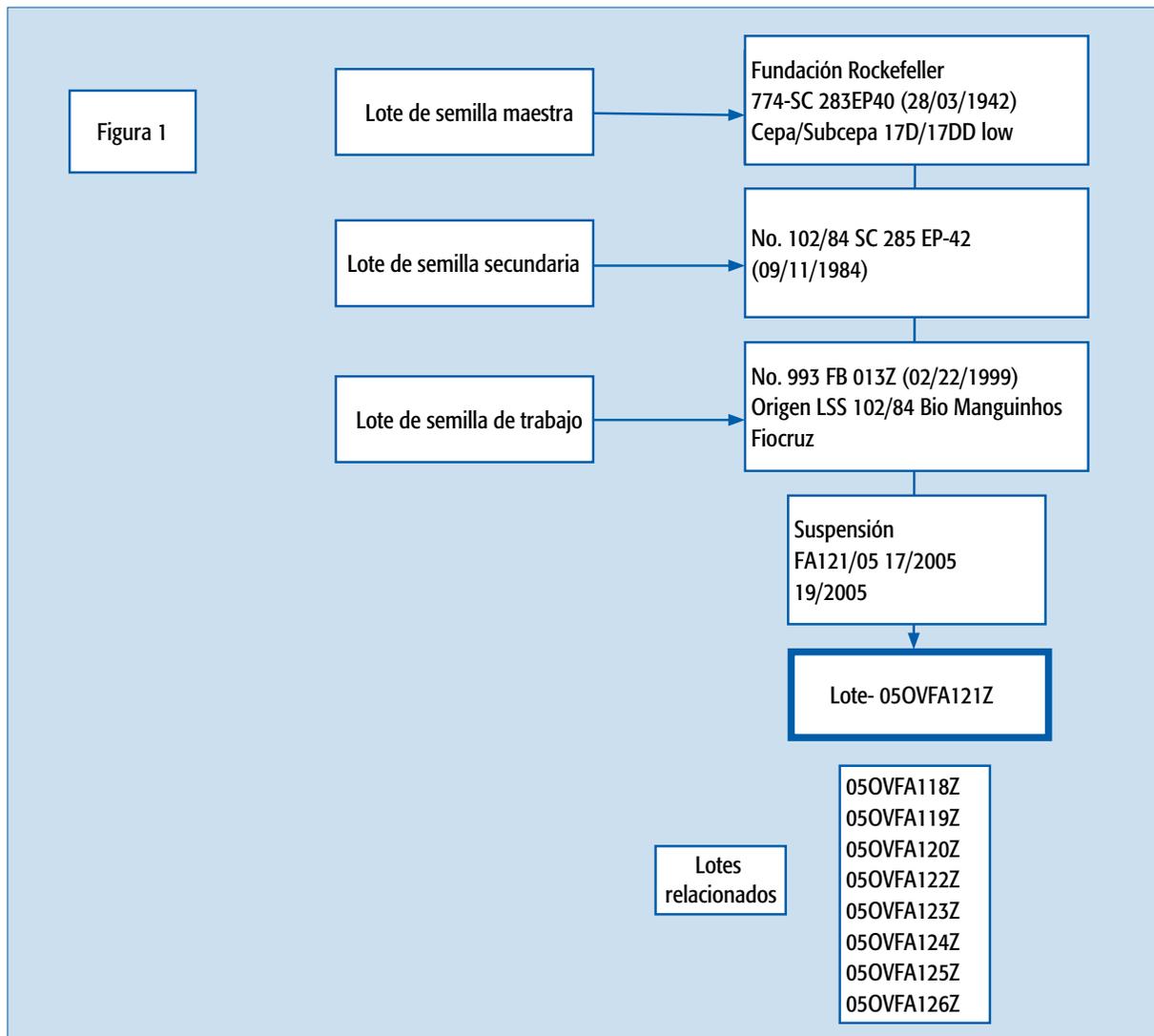
Sin embargo, la incidencia de YEL-AVD en Ica es significativamente superior a la observada en episodios anteriores, en que la tasa general era aproximadamente de 0,3 por 100.000. La probabilidad de que se produzcan cuatro casos después de administrar 43.000 dosis es de 0,00001. Ya que no existía ninguna diferencia estadísticamente significativa en la incidencia entre los diferentes lotes, y la secuencia genómica no había cambiado, lo más probable es que en los eventos ocurridos en Perú hubieran intervenido uno o más de los siguientes factores, potenciales contribuyentes a la aparición de los casos fatales: factores del huésped que hubieran incrementado la sensibilidad al VFA 17DD, algún agente sobreañadido no identificado, infecciones concomitantes, o circulación previa de otros agentes desconocidos en la zona afectada por el terremoto. Es evidente que persiste la incertidumbre al respecto, sin embargo, debe señalarse que los lotes de vacuna fueron sometidos por parte del fabricante a procedimientos de control y garantía de la calidad que incluyeron comprobaciones de la presencia de bacterias, hongos, micoplasmas y varios agentes virales aviares contaminantes conocidos (aunque no virus de mamíferos) en los preparados de las vacunas, y los resultados fueron negativos.

En conclusión, los estudios virológicos realizados después de las muertes no demuestran la intervención del virus de la vacuna en las defunciones, con base en los estudios llevados a cabo hasta la fecha. Debe considerarse la realización de otros estudios adicionales con objeto de proseguir la investigación de estos ESAVI aparecidos después de la vacunación contra fiebre amarilla y elaborar hipótesis que expliquen la acumulación de casos, y este subcomité quisiera contribuir a la realización de tales estudios. Además, se deben obtener y conservar de manera ordenada muestras de todos los casos de ESAVI asociados a la vacuna antiamarílica con objeto de que se puedan realizar estudios de investigación sistemáticos y uniformes de todos ellos y que los datos sean comparables. Solo de esta manera podremos comprender el mecanismo de los graves ESAVI aparecidos después de la vacunación.

Introducción

Este informe describe los estudios virológicos sobre la fiebre amarilla realizados como parte de la investigación de cuatro defunciones ocurridas en octubre del 2007 posteriormente a la administración de la vacuna 17DD fabricada por Bio-Manguinhos. Debe señalarse que los estudios se limitaron a la investigación del virus de la vacuna 17DD para determinar si existía alguna modificación en el virus de la vacuna administrada a las personas que fallecieron o en el virus de la vacuna que se multiplicó en las personas vacunadas. Aparte de las pruebas ordinarias realizadas por el fabricante durante la producción de la vacuna (que no revelaron nada fuera de lo normal), no se realizaron estudios en busca de agentes contaminantes u otros agentes infecciosos que pudieran haber actuado como cofactores en los casos fatales.

Las cuatro defunciones ocurrieron en el Departamento de Ica del Perú posteriormente a la vacunación con un lote particular de vacuna, el 050-VFA-121Z. Nota: en el mismo Departamento, también se utilizó otro lote, el 050-VFA-123Z, sin que se produjera ningún ESAVI grave asociado. En la figura 1 se muestra el linaje del lote 050-VFA-121Z.



Las cuatro personas que murieron después de recibir la vacuna reunían las siguientes características:

Caso 1: mujer de 23 años de edad

Caso 2: mujer de 24 años de edad

Caso 3: varón de 79 años de edad

Caso 4: mujer de 49 años de edad

Laboratorios que participaron en los estudios virológicos

Los estudios iniciales se realizaron en Perú, en el Instituto nacional de la Salud (INS) y en el Destacamento del Centro naval de Investigación Médica de Estados Unidos (NMRC). Posteriormente, las muestras se enviaron a los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos en Atlanta (CDC-ATL) y algunos de ellos remitieron a la División de Enfermedades Infecciosas de Transmisión Vectorial de los CDC en Fort Collins (CDC-FC). Además, se enviaron cinco lotes de vacuna del INS a los CDC-FC (cuadro 1).

Cuadro 1: Vacuna antiamarilla recibida en los CDC procedente del INS		
Número	Producto	Número de lote
1	Vacuna liofilizada	050-VFA-119Z
	Diluyente	057-DFA-053Z
2	Vacuna liofilizada	050-VFA-121Z
	Diluyente	058-DFA-056Z
3	Vacuna liofilizada	050-VFA-123Z
	Diluyente	057-DFA-053Z
4	Vacuna liofilizada	050-VFA-124Z
	Diluyente	057-DFA-053Z
5	Vacuna liofilizada	050-VFA-125Z
	Diluyente	057-DFA-053Z

Estudios de secuenciación de los nucleótidos de las muestras procedentes de los pacientes

Los primeros estudios virológicos se realizaron en Perú, donde el INS y el NMRC, mediante RT-PCR, empezaron a aislar el virus de las muestras clínicas. Ambos laboratorios usaron RT-PCR con base en el gen proteico de la envoltura y obtuvieron datos de la secuencia consenso que indicaban la presencia de ARN del virus de la vacuna 17DD en las muestras de los casos 1 y 2.

Los estudios posteriores realizados en los CDC-FC permitieron determinar las secuencias consenso de nucleótidos del genoma completo de algunas muestras (incluidas las secuencias genómicas completas de los casos 1 [del pulmón] y 2 [del hígado]) (cuadro 2).

Cuadro 2: Comparación de las secuencias consenso genómicas de los casos 1 y 2 con las secuencias genómicas de la vacuna 17DD publicadas en Genbank y la semilla secundaria 102/84 de Bio-Manguinhos.

Nucleótido	17DD original en GenBank U17066	Semilla secundaria 102/84 del cuadro 1 de Galler y cols. Virology, 2001	CASO 1 análisis 25% mixto	Observaciones	CASO 2 análisis 25% mixto	Observaciones
1003	T	T/C	T	C visible en 10%	T/C	
2110	A	G	G		G	
2356	T	C	C		C	
2677	C/T	T	T		T	
4523	C/T	C/T	C/T (1:1)		C/T	
4921	G	G			A	SILENCIOSA
4948	C	C	C		C	T 20% visible en 2 de las 6 lecturas. SILENCIOSA
5362	A	C	C		C	
6673	T	T*	C/T (1:1)	silenciosa	C/T	
9988	C	C/T	C	C visible en 10%	C/T	
10,174	A	A/G	A	G visible en 10%	R	
10,243	A/G	G	G		G	
10,291	C	C	C		Y	
10,367	C/T	T	T		T	
10,675	A	A/G	A/G		A/G	

* Marchevsky observa C/T en esta posición de la semilla secundaria

Los resultados se resumen de la siguiente manera:

Caso 1: La secuencia consenso genética completa del ARN viral hallado en el pulmón del primer caso es indistinguible de la secuencia de la semilla secundaria 102/84 publicada por Galler y cols. Nota: existe una cepa procedente del caso 1 pero no se ha secuenciado.

Caso 2: La secuencia consenso genética completa del ARN viral secuenciado directamente a partir del tejido hepático es indistinguible de la secuencia de la semilla secundaria 102/84 publicada por Galler y cols., con la excepción de una mutación silenciosa en la posición nucleotídica 4921 (GA; NS3).

Caso 3: Solo fue posible realizar la RT-PCR de una porción del genoma, aunque se hicieron muchos intentos con todos los tejidos de que se disponía. Solo existen datos parciales de la secuencia del caso 3; se generaron 2870 bases (posiciones nucleotídicas 1550 a 2870 y 6235 a 8435). En estas regiones la secuencia es indistinguible de la del lote de semilla secundaria 17DD.

Caso 4: No se dispone de muestras para su caracterización.

Debe observarse que se emplea el término “indistinguible” cuando la secuencia nucleotídica parece idéntica, aunque no puede excluirse una posible variación en una pequeña parte de los ARN de la población de virus de la vacuna (probablemente menos de 10%).

Se realizaron amplios estudios dirigidos a caracterizar los aspectos virológicos de los cuatro casos. Estos estudios se resumen en los cuadros 3 a 6.

Las PFUeq/ml se determinaron mediante diluciones de análisis paralelas de virus 17D de la fiebre amarilla para ensayo de placas y RT-PCR en tiempo real. Los datos se utilizan para construir una curva estándar que permita calcular el número de PFU presentes en las muestras originales. Este método da por supuesto que existe una proporción bastante constante entre las PFU y el número de copias virales entre las preparaciones de virus 17D de la fiebre amarilla. Sin embargo, hemos observado que esta proporción puede variar hasta en diez veces; por consiguiente, la cantidad de PFUeq/ml podría ser diez veces inexacta.

Cuadro 3: Aspectos virológicos del caso 1

Caso 1, mujer de 23 años

Fecha de la vacunación: 27 de septiembre del 2007

Fecha de aparición de la enfermedad: 28 de septiembre del 2007

Fecha de la muerte: 6 de octubre del 2007

Pruebas relacionadas con la fiebre amarilla			Resultados de las pruebas según la ubicación			
Prueba de laboratorio	Muestra	Fecha de la muestra	INS - Perú	NMRCD - Perú	CDC	CDC
IgM mediante ELISA	Suero	6-Oct-07	Positiva	Negativa	Positiva	
IgG mediante ELISA	Suero	6-Oct-07	Negativa	Negativa	Negativa	
PRNT	Suero	6-Oct-07	NP	NP	160	
RT-PCR	Suero	6-Oct-07	Positiva	NP	Positiva	Cuantitativa PFUeq/ml 3924000
	OriNP	6-Oct-07	Positiva	NP	Positiva	68
	Pulmón	6-Oct-07	Positiva	NP	Positiva*	7600000
	Hígado	6-Oct-07	Positiva	NP	Positiva	11600
	Riñón	6-Oct-07	Positiva	NP	Positiva	350000
	Cerebro	6-Oct-07	Positiva	NP	Positiva	39320
Cultivo	Suero	6-Oct-07	Positiva	NP	Positiva	
	Orina	6-Oct-07	NP	NP	Sin crecimiento	
	Pulmón	6-Oct-07	NP	NP	Sin crecimiento	
	Hígado	6-Oct-07	Positiva	NP	Sin crecimiento	
	Riñón	6-Oct-07	Sin crecimiento	NP	Sin crecimiento	
	Cerebro	6-Oct-07	Positiva	NP	Positiva	
	Bazo	6-Oct-07	Sin crecimiento	NP	NP	
Histopatología - Tinción IHC	Pulmón	6-Oct-07	NP	NP	Positiva - abundante	
	Hígado	6-Oct-07	Positiva	NP	Positiva - abundante	
	Riñón	6-Oct-07	NP	NP	Positiva - abundante	
	Cerebro	6-Oct-07	NP	NP	Positiva - escasa	

NP = no procede (prueba no realizada)

* La secuencia de ARN del tejido del pulmón es idéntica a la secuencia de referencia del 17-DD.

Cuadro 4: Aspectos virológicos del caso 2

Caso 2, mujer de 24 años						
		Fecha de la vacunación: 27 de septiembre del 2007				
		Fecha de aparición de la enfermedad: 27 de septiembre del 2007				
		Fecha de la muerte: 11 de octubre del 2007				
Pruebas relacionadas con la fiebre amarilla			Resultados de las pruebas según la ubicación			
Prueba de laboratorio	Muestra	Fecha de la muestra	INS - Perú	NMRCD - Perú	CDC	CDC
IgM mediante ELISA	Suero	8-Oct-07	NP	Positiva	Positiva	
	Suero 1	5-Oct-07	Positiva	NP	NP	
	Orina	5-Oct-07	Positiva	NP	NP	
IgG mediante ELISA	Suero	8-Oct-07	NP	Negativa	Negativa	
	Suero 1	5-Oct-07	Negativa	NP	NP	
	Orina	5-Oct-07	Negativa	NP	NP	
PRNT	Suero	8-Oct-07	NP	NP	10,240	
RT-PCR	Suero	5 o 8-Oct-07	Positiva *	Negativa	Positiva	Cuantitativa PFUeq/ml 262
	Orina	5-Oct-07	Positiva	NP	Positiva	956
	Pulmón	11-Oct-07	Positiva	Negativa	Positiva	464
	Hígado	11-Oct-07	Positiva	Positiva	Positiva ***	10,960
	Riñón	11-Oct-07	Positiva	Negativa	Positiva	247
	Cerebro	11-Oct-07	Positiva	Positiva **	Positiva	4,160
	Bazo	11-Oct-07	NP	Negativa	NP	NP
	Sangre	11-Oct-07	NP	Negativa	NP	NP
	Cultivo	Suero	5 o 8-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Orina		5-Oct-07	NP	NP	Sin crecimiento	
Pulmón		11-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	
Hígado		11-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	
Riñón		11-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	
Cerebro		11-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	
Bazo		11-Oct-07	NP	Sin crecimiento	NP	
Histopatología - Tinción IHC	Pulmón	11-Oct-07	NP	NP	Positiva - escasa	
	Hígado	11-Oct-07	Negativa	NP	Positiva - escasa	
	Riñón	11-Oct-07	NP	NP	Positiva - escasa	
	Cerebro	11-Oct-07	NP	NP	Negativa	

NP = no procede (prueba no realizada)

* La secuencia del fragmento obtenido por PCR en suero es compatible con la glucoproteína E del virus de la fiebre amarilla.

** La secuencia del fragmento obtenido por PCR en cerebro es 100% idéntica a la región E del 17-DD.

*** La secuencia del ARN del tejido es idéntica a la cepa de referencia 17 DD, a excepción de un cambio nucleotídico silencioso.

Cuadro 5: Aspectos virológicos del caso 3

Caso 3, varón de 79 años

Fecha de la vacunación: 1 de octubre del 2007

Fecha de aparición de la enfermedad: 4 de octubre del 2007

Fecha de la muerte: 12 de octubre del 2007

Pruebas relacionadas con la fiebre amarilla		Resultados de las pruebas según la ubicación				
Prueba de laboratorio	Muestra	Fecha de la muestra	INS - Perú	NMRCD - Perú	CDC	CDC
IgM mediante ELISA	Suero	8-Oct-07	Negativa	Positiva	Positiva	
IgG mediante ELISA	Suero	8-Oct-07	Negativa	Negativa	Negativa	
PRNT	Suero	8-Oct-07	NP	NP	Muestra insuficiente	
RT-PCR	Suero	8-Oct-07	Positiva	Negativa	Positiva	Cuantitativa PFUeq/ml 192
	Pulmón	12-Oct-07	Positiva	Negativa	Positiva	2,084
	Hígado	12-Oct-07	Positiva	Negativa	Positiva *	35.360 *
	Riñón	12-Oct-07	Positiva	Negativa	Positiva **	27,160
	Cerebro	12-Oct-07	NP	Negativa	Positiva	264
	Bazo	12-Oct-07	Positiva	Negativa	NP *	NP *
Cultivo	Suero	11-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	
	Pulmón	12-Oct-07	NP	Sin crecimiento	Sin crecimiento	
	Hígado	12-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento *	
	Riñón	12-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	
	Cerebro	12-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	
	Bazo	12-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	NP *	
Histopatología - Tinción IHC	Pulmón	12-Oct-07	NP	NP	Negativa	
	Hígado	12-Oct-07	NP	NP	Positiva	
	Riñón	12-Oct-07	NP	NP	Negativa	
	Cerebro	12-Oct-07	NP	NP	Negativa	
	Bazo	12-Oct-07	NP	NP	Positiva - escasa	

NP = no procede (prueba no realizada)

* Nota: El tejido fijado recibido por los CDC y etiquetado como "hígado" correspondía en realidad a bazo. Por consiguiente, no se sabe con certeza si el tejido congelado empleado en las pruebas de RT-PCR y en el cultivo realizados en los CDC era de hígado o de bazo.

** En los CDC solo se pudo llevar a cabo la RT-PCR en un fragmento del genoma; se realizaron muchos intentos con todos los tejidos disponibles y los resultados corresponden al riñón. Los datos parciales de la secuenciación corresponden a 2870 bases (posiciones nucleotídicas 1550 a 2870 y 6235 a 8435). La secuencia en estas regiones fue idéntica a la del lote semilla 17DD.

Cuadro 6: Aspectos virológicos del caso 4

Caso 4, mujer de 49 años

Fecha de la vacunación: 24 de septiembre del 2007

Fecha de aparición de la enfermedad: 1 de octubre del 2007

Fecha de la muerte: 24 de octubre del 2007

Pruebas relacionadas con la fiebre amarilla			Resultados de las pruebas según la ubicación				
Prueba de laboratorio	Muestra	Fecha de la muestra *	INS - Perú	NMRCD - Perú	CDC	CDC	
IgM mediante ELISA	Suero	24-Oct-07	Positiva	Positiva	Positiva	Cuantitativa PFUeq/ml	
IgG mediante ELISA	Suero	24-Oct-07	Negativa	Negativa	**		
PRNT	Suero	24-Oct-07	NP	NP	>20.480		
RT-PCR	Suero	24-Oct-07	Positiva	Negativa	Negativa		Negativa
	Pulmón	24-Oct-07	NP	NP	NP		NP
	Hígado	24-Oct-07	Positiva	Negativa	Muy débilmente positiva		3,3/4,8
	Riñón	24-Oct-07	NP	Negativa	Positiva		10,464
	Cerebro	24-Oct-07	NP	Negativa	Dudosa		NP
Cultivo	Suero	24-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	NP ***		
	Pulmón	24-Oct-07	NP	NP	NP		
	Hígado	24-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	NP ***		
	Riñón	24-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	NP		
	Cerebro	24-Oct-07	Sin crecimiento	Sin crecimiento	NP		
	Bazo	24-Oct-07	Sin crecimiento	NP	NP		
Histopatología - Tinción IHC	Pulmón	24-Oct-07	NP	NP	Negativa		
	Hígado	24-Oct-07	Positiva	NP	Negativa		
	Riñón	24-Oct-07	NP	NP	Positiva - abundante		
	Cerebro	24-Oct-07	NP	NP	Negativa		

NP = no procede (prueba no realizada)

* Las muestras se obtuvieron el 25 de octubre del 2007; un día después de la muerte del paciente.

** La elevada actividad de fondo impidió la interpretación.

*** Dado el muy reducido número de copias o la escasa detección de virus mediante la RT-PCR cuantitativa, no se intentó cultivar las muestras.

Nota: En los CDC no se pudo obtener suficiente ARN de los tejidos como para realizar la secuenciación.

Estabilidad del virus del lote 050-VFA-121Z

Bio-Manguinhos (mediante los PNT actuales requeridos para la precalificación de la OMS) y los CDC-FC también llevaron a cabo estudios para verificar la estabilidad del virus del lote 050-VFA-121Z.

Bio-Manguinhos descubrió que no existía ninguna pérdida significativa en cuanto a infectividad (expresada como \log_{10} PFU) en las muestras del lote conservadas por el fabricante.

	Datos del 11-8-05	Datos del 12-4-07
2-8°C	5,16/dosis	4,90/dosis
37°C durante 14 días	4,75/dosis	4,70/dosis

En los CDC-FC se utilizaron viales no abiertos de la vacuna proporcionados por el INS en noviembre del 2007, se reconstituyó un vial y se analizó su infectividad en células Vero. Los resultados fueron los siguientes (\log_{10} PFU/ml):

Lote 050-VFA-119Z: 4,96 PFU/ml

Lote 050-VFA-121Z: 5,33 PFU/ml

Lote 050-VFA-123Z: 4,87 PFU/ml

Lote 050-VFA-124Z: 5,08 PFU/ml

Lote 050-VFA-125Z: 4,97 PFU/ml

Aunque los resultados obtenidos en los dos laboratorios no pueden compararse directamente, estos indican que los títulos detectados en los lotes de la vacuna se mantenían dentro del intervalo de las especificaciones de potencia, a pesar de que la vacuna caducaba en octubre del 2007. Por otra parte, los resultados indican que se había mantenido la cadena de frío durante el transporte del lote 050-VFA-121Z, ya que este, antes de utilizarse en el Departamento de Ica, se había transportado a diferentes lugares de Venezuela, Bolivia y Perú.

Heterogeneidad de los ARN virales en la población de la vacuna

En los CDC-FC, se realizó la secuenciación clonal de los ARN virales extraídos directamente de tres lotes de la vacuna (050-VFA-119Z, -121 y -123). Los ARN extraídos fueron amplificados mediante RT-PCR, empleando un estuche comercial de alta precisión, y clonados en vectores de Invitrogen TA. Se seleccionaron aleatoriamente noventa y seis colonias blancas de cada transformación; y los plásmidos recombinantes, amplificados directamente a partir de colonias de *E. coli*, se emplearon como plantillas para la secuenciación mediante una enzima de círculo rodante de gran precisión (polimerasa de Phi-29).

La secuenciación clonal se centró únicamente en el gen de la proteína E (con algún gen NS1), entre los nucleótidos genómicos 1249 y 2646. Se secuenciaron entre 75 y 78 clones seleccionados aleatoriamente de cada lote. Se contaron los cambios nucleotídicos observados en todos los clones y se clasificaron según condujeran a una sustitución de aminoácidos o no (mutación silenciosa). En el cuadro 7 aparece un resumen de los resultados de la secuenciación clonal.

Cuadro 7. Resultados de la secuenciación clonal de tres lotes de la vacuna antiamarillica

Lote	Número de clones secuenciados	Número (y porcentaje) de clones variantes por lote	Sustituciones nucleotídicas			
			Total	Con sustitución de AA	Mutaciones silenciosas	Porcentaje del total con sustitución de AA
119	75	43 (57)	119	50	69	42
121	78	57 (73)	121	54	67	48
123	76	37 (49)	123	35	88	28

Este estudio descubrió que el porcentaje de sitios variables detectados mediante secuenciación clonal en cualquier lote de la vacuna era de 8,5 a 8,9%. Sin embargo, si se tenía en cuenta el número total de nucleótidos secuenciados [número de cambios nucleotídicos/(número de clones secuenciados x 1.397 pares de bases)], se obtenía un 0,11% de cambios nucleotídicos en los lotes 119 y 121 y un 0,12% en el lote 123. El porcentaje global de sustituciones de aminoácidos [número de sustituciones/(número de clones secuenciados x 466 aminoácidos)] fue de 0,14% en el lote 119, 0,15% en el lote 121, y 0,10% en el lote 123.

En el apéndice, pueden consultarse los datos crudos correspondientes a los clones secuenciados. El número máximo de cambios nucleotídicos observados en un clon fue de 7 (0,5% de cambios nucleotídicos), en el clon 11E del lote 119. El número máximo de sustituciones de aminoácidos por clon fue de 4 (0,86% de AA cambiados), observado en cuatro clones de dos lotes (clones 6F y 11E del lote 119, y clones 3D y 4B del lote 121). El sitio que experimentó más frecuentemente una mutación fue el correspondiente a la posición A2093, mutada en seis clones (todos ellos del lote 119). Hubo 16 posiciones nucleotídicas en que se observó la misma mutación en más de un lote de la vacuna.

Es interesante señalar que un clon del lote 121, el clon 3D, presentaba dos sustituciones de aminoácidos (AA) en regiones que correspondían a epítomos importantes de células B: el AA de la proteína E en posición 104, epítomo de células B reconocido por anticuerpos monoclonales específicos para el grupo de los flavivirus (tales como los 4G2, 6B6C-1), y el AA de E en posición 153, un residuo identificado mediante el estudio de variantes de escape a la neutralización, que emplea anticuerpos monoclonales humanos derivados de personas vacunadas con 17D. También se había observado previamente una sustitución de aminoácidos en el AA de E en posición 153 en otro caso de enfermedad viscerotrópica (Martín y cols., *Lancet* 2001 358: 98-104). No se detectó ninguna de estas dos sustituciones de AA en los lotes 119 y 123.

Aunque la población de variantes del lote implicado, el 121, es diferente de las de los otros lotes secuenciados, las secuencias consenso de las cepas procedentes de los órganos vitales de dos de los casos fatales no mostraron un dominio de las subpoblaciones representativas de las mutaciones en E104 o E153, lo que indicaba que estas mutantes no habían pasado a ser dominantes *in vivo* y, por consiguiente, era improbable que fueran responsables de los eventos mórbidos. Se acepta en general que la secuenciación de consenso es bastante sensible como para revelar la presencia de un virus mutante en el 10% de la población total de viriones. Por lo tanto, actualmente no hay indicios de que los virus mutantes aparentemente identificados *in vitro* existan *in vivo*, incluidos los tejidos de los pacientes. Se desconoce si una población viral minoritaria, aunque fuera virulenta, podría tener una expresión mórbida.

Limitaciones de la secuenciación clonal

Entre las limitaciones de la secuenciación clonal, se reconocen las siguientes:

- el proceso de secuenciación clonal podría conducir a la introducción de cambios en los nucleótidos;
- no es posible determinar si los cambios observados podrían conducir a cambios fenotípicos o si todos los ARN virales se encuentran en los virus infectantes; y
- solo se estudió la secuencia de la proteína E y no se exploraron otras zonas del gen que podrían influir en la virulencia de virus.

Resumen de la secuenciación clonal

Los datos de la secuenciación clonal del gen de la proteína E correspondiente a tres lotes de la vacuna indican que existen clones variantes en cada uno de los lotes (49 a 73% de los clones) y que, aproximadamente, el 9% de la región secuenciada contiene secuencias variantes. Ya se había señalado anteriormente la heterogeneidad de los virus de la vacuna antiamarilica. Los datos de la secuencia genómica obtenidos a partir de las muestras de los pacientes indican que ninguna de las variantes que aparecen en la población de la vacuna se potenciaron en los pacientes hasta alcanzar un nivel significativo que pudiera detectarse mediante la secuenciación directa.

Posibilidad de que se segregue una población variante de virus en un lote de vacuna

El director de producción de la vacuna antiamarilica en Bio-Manguinhos resumió la situación de la siguiente manera: supóngase un ciclo corriente de producción en el que se inoculan aproximadamente 2.400 huevos embrionados con una suspensión del lote semilla. Después de la incubación, los embriones se recogen en grupos de 40 y se homogenizan. Se mezclan y se centrifugan los grupos de 40 de dos en dos. Se aspira el sobrenadante en un matraz que, después de que se le añada un estabilizador, contendrá aproximadamente 450 ml de suspensión, equivalente a 80 embriones. Por consiguiente, la inoculación de los 2.400 huevos producirá al final del día 30 matraces de estas características, cada uno de los cuales se somete a pruebas de potencia y esterilidad. Este grupo de 30 matraces se codifica y constituye la suspensión viral intermedia. Cuando los procedimientos de control de calidad suministran los datos en materia de potencia y esterilidad, ya se puede continuar su procesamiento. Para preparar un lote de la vacuna, se emplearán

como mínimo de seis a siete matraces, que se mezclan y formulan antes de proceder al envasado y la liofilización. El procesamiento de seis a siete matraces de la suspensión viral intermedia proporcionará más de 40.000 viales de 5 dosis. Por consiguiente, cada lote contendrá virus procedentes de 420 a 560 embriones.

Es evidente que el virus de un huevo "anómalo" podría acabar segregado en un solo lote. En consecuencia, la cantidad de virus anómalo (la población de un huevo con un cambio de nucleótidos o aminoácidos significativo en cuanto a virulencia) por dosis sería aproximadamente de 50 PFU, suponiendo que el virus procedente de un huevo corresponde aproximadamente al 0,17% del número total de virus contenido en un lote constituido por 560 embriones y una dosis humana de 4,5 log₁₀ PFU.

Discusión

El lote 050-VFA-121Z se administró a 42.742 personas en el Departamento de Ica del Perú y, lamentablemente, cuatro de ellas murieron. Estas cuatro personas no estaban ubicadas en una zona específica del Departamento y residían en tres de las cinco provincias que componen el Departamento. Por otra parte, 20.432 personas residentes en el Departamento de Ica recibieron el lote 050-VFA-123Z y no se notificó ningún ESAVI grave entre ellas. Es la primera vez que se notifica una agrupación de defunciones después de la administración de un lote específico de vacuna anti amarilla. Estudios anteriores de ESAVI indican que la incidencia de defunciones consecutivas a la administración de la vacuna anti amarilla es de 0,3 por 100.000, mientras que esta agrupación representa una tasa de 10 por 100.000. La probabilidad de que ello ocurra es de 0,00001, lo que indica que existen factores exclusivos de esta situación en el Perú. La hipótesis actualmente adoptada para explicar las defunciones es la intervención de factores del huésped (genéticos o de respuesta inmunitaria) pero ello no es compatible con la agrupación observada en el Perú. Los estudios virológicos realizados posteriormente a las defunciones no han logrado determinar una intervención del virus de la vacuna en las defunciones, con base en los estudios llevados a cabo hasta la fecha. Aunque existen muchos puntos que son objeto de debate y que podrían generar hipótesis que explicarían la agrupación de muertes, el aspecto principal es la escasa investigación llevada a cabo para investigar los ESAVI de fiebre amarilla y la evidente necesidad de elaborar un programa de investigaciones para estudiar este tipo de eventos y de realizar nuevos estudios sobre los casos ocurridos en el Perú. Este subcomité quisiera contribuir a tales estudios. En particular, es preciso que se proceda a la recogida y almacenamiento ordenado de muestras de todos los casos de ESAVI de fiebre amarilla, con objeto de que se puedan realizar estudios de investigación sistemáticos y uniformes de todos ellos, y que los datos sean comparables. Solo de esta manera llegaremos a comprender el mecanismo de los ESAVI.
