

García León, Miguel Leonardo*
Wong Chew, Rosa María*

La vacuna contra la rubéola produce una respuesta inmune combinada celular y humoral en adultos

Rubella vaccine elicited a combined cellular and humoral immune response in adults

Fecha de aceptación: junio 2018

Resumen

INTRODUCCIÓN. La vacunación contra la rubéola aumenta los anticuerpos igg específicos; sin embargo, la información sobre la respuesta inmune celular en adultos sanos es limitada. En este estudio se caracterizó la respuesta inmune humoral (ih) y celular (ic) en adultos sanos inmunizados con vacuna contra la rubéola.

MATERIAL Y MÉTODOS. Veinte adultos sanos, de entre 20 y 34 años de edad, recibieron la vacuna Priorix (srp). La ih se midió mediante la prueba de elisa y la ic se midió con un ensayo de linfoproliferación específico antes, uno y tres meses después de la vacunación. Se registraron los eventos adversos asociados.

RESULTADOS. Se observó seroconversión en dos pacientes seronegativos (20%) en ausencia de ic. La seroconversión global definida como seronegativa a seropositiva o un aumento cuádruple de los títulos basales fue de 20% (4/20). La seroprevalencia de rubéola fue de 90% (18/20) y la seropositividad fue de 100% tres meses después de la vacunación ($p = 0.24$). La cifra de adultos con un índice de estimulación (ie) >3 fue de 40%, con una media $ie \pm ee$ de 3.37 ± 0.49 antes, y de 3.63 ± 0.84 y 50% y 3.39 ± 0.44 uno y tres meses después de la vacunación, respectivamente. Se observó una respuesta de ic de refuerzo en tres adultos inmunizados con títulos protectores previos.

CONCLUSIONES. En este estudio, la seropositividad a rubéola fue de 90%. Se observó una respuesta celular de refuerzo en tres pacientes, sin aumento en los títulos de igg. En las dos personas seronegativas hubo una seroconversión en ausencia de ic. No hubo respuesta de refuerzo de anticuerpos en sujetos con títulos de anticuerpos altos. La inmunización con la vacuna contra rubéola en adultos sanos puede provocar una respuesta inmune de refuerzo humoral y/o celular.

Palabras clave: vacuna contra rubéola, respuesta inmune celular, respuesta inmune humoral, adultos, México.

Abstract

INTRODUCTION. Vaccination with rubella increases igg antibodies; however, information is limited about the cellular immune response in healthy adults. Humoral (hi) and cellular (ci) immune response were characterized in healthy adults immunized with rubella vaccine.

MATERIAL AND METHODS. Twenty healthy adults, from 20 to 34 years old received Priorix (mmr) vaccine. hi was measured by elisa and ci was measured by a specific lymphoproliferation assay, before and at one and three months after vaccination. Clinical symptoms were recorded.

RESULTS. Seroconversion was observed in two seronegative subjects (20%) in the absence of ci. The overall seroconversion defined as seronegative to seropositive or a fourfold increase from basal titers was 20% (4/20). Seroprevalence for rubella was 90% (18/20) and seropositivity was 100% three months post-vaccination ($p = 0.24$). The percentage of adults with a stimulation index (si) >3 and mean $si \pm se$ was 40% and 3.37 ± 0.49 before, 40% and 3.63 ± 0.84 and 50% and 3.39 ± 0.44 one and three months after vaccination, respectively. A booster ci response in three immunized adults with previous protective titers was observed.

CONCLUSIONS. Rubella seropositivity in our study was 90%. We observed a booster ci response in three subjects, without increase in igg titers. In the two seronegative subjects there was a seroconversion in the absence of ci. There was no antibody booster response in subjects with high titers of antibodies. The immunization with rubella vaccine in healthy adults can elicit a booster hi and/or ci.

Keywords: rubella vaccine, cellular and/or humoral immune response, adults, Mexico.

* Facultad de Medicina, División de Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Correspondencia: Dra. Rosa María Wong-Chew
Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas.
División de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM.

Circuito escolar s/n, Torre de investigación, 6o. piso, Ciudad Universitaria. C.P. 04510, Ciudad de México.

Dirección electrónica: rmwong@unam.mx
Teléfono: (52 55) 56 23 2300, ext. 43193

Introducción

La rubéola es una enfermedad viral común en la infancia, con una distribución mundial,¹ generalmente con síntomas sistémicos mínimos. La artropatía transitoria puede ocurrir en adultos, pero las complicaciones graves son raras. Aunque es una enfermedad asociada a la infancia, entre 6 y 25% de las mujeres en edad reproductiva son seronegativas a la rubéola y pueden padecer la enfermedad si llegan a exponerse.^{2,3} Si la madre se infecta entre las primeras 20 semanas de embarazo, la complicación más importante es el riesgo de que el niño nazca con el síndrome de rubéola congénita (SRC).^{1,4}

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se producen más de cien mil casos de SRC en todo el mundo.^{5,6} Las infecciones por rubéola se previenen mediante la inmunización activa con vacunas vivas atenuadas. Las vacunas de virus vivos atenuados, con las cepas RA 27/3 y Cendehill, son eficaces en la prevención del síndrome de rubéola congénita. Las vacunas vivas atenuadas de rubéola se licenciaron por primera vez en Estados Unidos en la década de 1960. La cepa de rubéola RA 27/3 que se cultiva en células diploides humanas ahora se utiliza en las vacunas contra rubéola en la mayor parte del mundo.¹ La seroconversión a la vacuna es de 95% en lactantes mayores de 11 meses, y los anticuerpos duran más de 21 años.⁷ Sin embargo, en algunas personas vacunadas las concentraciones de anticuerpos pueden disminuir con el tiempo a menos de 10 UI/mL.¹

Los programas de inmunización han tenido un gran efecto en la epidemiología de la rubéola en muchos países desarrollados y en varios países en desarrollo. En algunos países de Europa, así como en Estados Unidos y Australia el SRC es muy raro, y en los países donde se usan dos dosis de vacuna contra sarampión, rubéola y paperas (SRP) se ha interrumpido la transmisión autóctona del virus de la rubéola.⁸ Aun con las estrategias efectivas de vacunación, todavía se producen brotes ocasionales de rubéola. La prevalencia de esta enfermedad ha aumentado en Europa Central y Oriental, sobre todo en Estados recientemente independizados se produjo una gran epidemia entre 1998 y 2000.⁹ La OMS reportó 121 378 casos en 2009 y 23 757 casos en 2015, con la mayor proporción en el Pacífico occidental con 9 398 casos, seguido por África con 6 515 casos, y el Mediterráneo oriental con 1 885 casos.¹⁰

Tradicionalmente, la inmunidad contra el virus de la rubéola se ha medido con los niveles de anticuerpos específicos contra la rubéola utilizando títulos de inhibición de la hemaglutinación o inmunoensayo enzimático.^{11,12} Además de la inmunidad humoral, la inmunidad celular es importante para la eliminación del virus. Los linfocitos T específicos se pueden medir con ensayos de linfoproliferación entre 10 y 14 días después de la infección o de la vacunación.¹³⁻¹⁵

La inmunización de refuerzo con la vacuna contra rubéola estimula una respuesta inmune secundaria que generalmente se observa por un aumento rápido de anticuerpos IgG específicos contra la rubéola.¹⁶ Cuando se usa la proliferación de células T estimuladas con antígeno de rubéola para evaluar la inmunidad celular, la respuesta de memoria se ha reportado en 88% de las personas que tenían infección por rubéola natural, y en 24% de niños que recibieron una dosis de la vacuna viva atenuada de rubéola.¹⁷

El objetivo de este estudio fue caracterizar la respuesta inmune celular y humoral en adultos sanos que recibieron una vacunación primaria o de refuerzo con rubéola.

Material y métodos

Población de estudio

Se incluyó a veinte adultos de entre 20 y 34 años, nueve hombres y 11 mujeres, en el estudio de febrero a abril de 2006. Ninguno de ellos tenía antecedentes de vacunación contra rubéola durante la infancia o la edad adulta, excepto una persona que recibió SRP dos años antes. Las respuestas celular y humoral se evaluaron antes, uno y tres meses después de la vacunación. Los síntomas clínicos después de la vacunación se evaluaron durante 30 días.

El estudio fue aprobado por los Comités de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México; se obtuvo el consentimiento por escrito de los participantes.

Vacuna contra la rubéola y administración de la vacuna

Se utilizó la vacuna SRP (Priorix, GSK) que contiene virus vivos atenuados de rubéola, cepa RA 27/3, liofilizados, con una potencia de $10^{3.0}$ UFP/0.5 mL, virus vivos atenuados de sarampión, cepa Schwarz, liofilizados, con una potencia de $10^{3.0}$ UFP/0.5 mL y virus vivos atenuados de parotiditis, cepa RIT 4385, liofilizados, con una potencia de $10^{3.0}$ UFP/0.5 mL. La vacuna se administró por inyección subcutánea en el área del deltoides del brazo izquierdo.

Ensayo de anticuerpos contra rubéola

Las muestras de suero se almacenaron a -70 °C. Las muestras de antes, uno y tres meses después de la vacunación, se corrieron en paralelo y se analizaron para detectar anticuerpos contra rubéola usando un ensayo de ELISA (International, Immuno-Diagnostics, Estados Unidos). Cinco μ L de suero en diluciones 1:40 se colocaron en pozos por duplicado. Los pozos estaban recubiertos con antígeno de rubéola, se añadieron anticuerpos anti-IgG humana y anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina para reconocer anticuerpos antirrubéola. Durante la etapa final se añadió un sustrato fluorescente con una emisión media de 450 nm, cuya intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de IgG contra rubéola. Se midió el valor relativo de fluorescencia (RFV) y se calcularon las unidades internacionales en función de los estándares. De acuerdo con el fabricante, los títulos inferiores a 1:15 se consideraron negativos y se les asignó un valor de 4 para el análisis estadístico. Se utilizó un título de 1:15, que anteriormente se correlacionaba con la protección contra la infección natural por rubéola, como definición de seroprotección. La seroconversión se definió como la transición de seronegativo a seropositivo o un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos por encima de los niveles antes de la vacunación.

Ensayo de proliferación de células T

Se separaron células mononucleares de sangre periférica (MNSP) de sangre completa mediante un gradiente con

Ficoll-Hypaque y se añadieron a placas de 96 pozos en concentraciones de 3×10^5 por pozo en RPMI 1640 (Gibco, Gaithersburg, MD) y 10% de suero humano normal (Sigma, St. Louis, Mo). El antígeno concentrado de rubéola KOS (Microbix Biosystems Inc. Toronto, Ontario, Canadá) preparado a partir de lisados de células Vero infectadas o un control celular no infectado se añadieron a diluciones de 1:4, 1:8 y 1:16 por triplicado. La proliferación de células T se midió añadiendo timidina tritiada ($2.5 \mu\text{Ci}$ por pozo) después de cinco días durante seis a 18 horas. La cantidad de radioactividad incorporada en el ADN en cada pozo se midió en un contador de centelleo beta. El índice de estimulación (IE) se calculó como la media de las cuentas por minuto (cpm) en los pozos estimulados con antígeno de rubéola divididos entre la media de las cpm de los pozos control. Un IE positivo a la rubéola no estaba estandarizado, analizamos los datos con dos puntos de corte 2.0 y 3.0 o más. Se usaron fitohemaglutinina (Difco, Detroit, Mich) y toxoide tetánico (Calbiochem, La Jolla, California) como controles positivos.

Análisis estadístico

Los índices de estimulación en pacientes individuales antes, uno y tres meses después de la vacunación se compararon usando la prueba de Friedman para medidas repetidas y prueba t. Los recíprocos de los títulos de rubéola se transformaron y se calcularon los títulos medios geométricos (TMG). Las diferencias en la prevalencia de los títulos de anticuerpos, prevacunación, uno y tres meses después de la vacunación se evaluaron mediante ANOVA y la prueba t de Student pareada. La significancia estadística se definió como $p < 0.05$.

Resultados

La evaluación de anticuerpos contra rubéola de los 20 participantes mostró que 18 (90%) tenían títulos de anticuerpos protectores, definidos como $>15 \text{ UI/ml}$ antes de la vacunación, el TMG fue de 82 (ic 95% 4-759). Dos sujetos, cuyos títulos iniciales fueron 4 UI/ml y 10 UI/ml , fueron los únicos participantes que mostraron un aumento en los títulos de anticuerpos: 28 UI/ml y 23 UI/ml al mes y 136 UI/ml y 60 UI/ml a los tres meses, respectivamente (figura 1). Estas personas tuvieron un aumento de cuatro veces del título basal tres meses después de la vacunación. Aunque los otros 18 participantes tuvieron un ligero aumento en los TMG durante el periodo de seguimiento, los TMG fueron de 80 UI/ml (ic 95% 23-770) al mes y 121 UI/ml (ic 95% 48-778) a las tres meses, respectivamente. Sin embargo, mediante el análisis ANOVA no hubo diferencias en distintos momentos después de la vacunación. La prueba t pareada no mostró diferencias entre los títulos prevacunación y posvacunación en aquellos con títulos iniciales $>15 \text{ UI/ml}$.

La seroconversión general fue de 20% (4/20). La seroprevalencia basal para rubéola fue de 90% (18/20) y tres meses después de la vacunación la seropositividad fue de 100% (20/20) ($p = 0.24$). En la respuesta inmune adaptativa encontramos que 55% de los participantes tuvieron respuesta inmune humoral y celular, y 45% sólo tuvo respuesta humoral, no detectamos un patrón de únicamente respuesta celular en ningún sujeto. Un adulto presentó fiebre (5%) en el día uno,

los otros participantes que fueron inmunizados no mostraron otros efectos temporalmente asociados a vacunación.

Las respuestas de proliferación de células T al antígeno de rubéola fueron >3.0 en 40% o >2.0 en 75% de los participantes antes de la vacunación; con una media de IE de 3.37 ± 0.49 . Observamos una respuesta de refuerzo en tres de los 12 sujetos con IE <3.0 antes de la vacunación que desarrollaron IE >3.0 un mes después de la vacunación, todos tenían anticuerpos protectores contra la rubéola antes de que se les aplicara la vacuna. Con el punto de corte en el IE de >2.0 observamos una respuesta de refuerzo en dos de las cinco personas con IE <2.0 antes de la vacunación que desarrollaron IE >2.0 un mes después de que recibieran la vacuna, sólo uno de ellos tenía anticuerpos protectores contra la rubéola antes de la vacunación. Las respuestas promedio \pm EE fueron 3.63 ± 0.84 antes y 3.39 ± 0.84 uno y tres meses después de la vacunación, respectivamente ($p = \text{ns}$), en contraste con un IE de 8.57 ± 5.01 en los tres participantes que tuvieron una respuesta un mes después de la vacunación (figuras 2 y 3). Ocho (40%) y 10 (50%) de los participantes tenían un IE >3.0 al mes y tres meses después de la vacunación ($p = \text{ns}$). Trece (65%) y 14 (70%) de ellos tenían un IE >2.0 al mes y tres meses después de aplicárseles la vacuna ($p = \text{ns}$).

Discusión

La vacuna contra la rubéola se introdujo en el programa de inmunización de México en 1998, con una primera dosis a los 12 meses y un refuerzo a los seis años. La cobertura adecuada de vacunación en niños de uno a cuatro años se ha mantenido estable.¹⁸

El SRC es una causa importante de ceguera, sordera, cardiopatía congénita y retraso mental. En 2003, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) determinó eliminar la rubéola y el SRC en el continente americano. Según la propuesta, se inició un programa oficial de vigilancia del sarampión-rubéola mediante la vigilancia de todas las enfermedades exantemáticas.¹⁹ En México se llevó a cabo una campaña de vacunación contra la rubéola para hombres y mujeres de 13 a 39 años de edad en 2004 y 2008.^{20,21} Entre 2000 y 2005 sólo se informaron 14 casos de SRC en México, de los cuales, 9/14 (64%) de las madres no tenían registro de vacunación. En 2007 se notificaron 81 casos de rubéola, 33 (41%) en personas de 15 a 44 años.²² Desde entonces y hasta diciembre de 2017 no se han reportado casos.²³ Recientemente, la OPS (2016) declaró a México "Sin rubéola y síndrome de rubéola congénita" debido a la aplicación constante, durante 15 años, de vacunación contra esta enfermedad.

Varios estudios muestran la eficacia protectora de las vacunas en términos de respuesta de anticuerpos, la vacuna contra rubéola no es la excepción. En diferentes estudios se ha demostrado la respuesta inmune inducida por la vacuna contra la rubéola utilizando diferentes cepas, en distintas edades de vacunación, una o dos dosis de vacuna y diversas vías de administración, como la vía respiratoria (aerosol). Estos estudios reportan de 95 a 100% de seroconversión con un aumento rápido y significativo de anticuerpos después de la vacunación.^{24,28} Diversas investigaciones han demostrado

anticuerpos duraderos contra el virus de la rubéola después de la vacunación subcutánea, incluso con una sola dosis.^{7,29} En este estudio, aunque es una muestra pequeña, 90% de los participantes mostraron niveles protectores de anticuerpos antes de la vacunación, en contraste con un reporte de 1993 con 71% de seroprevalencia en la población mexicana.³⁰ Un estudio llevado a cabo en Jalisco informó 94.7% de seroprevalencia a rubéola en una muestra pequeña de población adulta.³¹ La falta de antecedentes de vacunación o haber padecido la enfermedad, a excepción de uno de los participantes en este estudio, sugiere que están protegidos por inmunidad natural, probablemente por una infección subclínica.

La mayoría de las personas con antecedentes de rubéola o inmunización previa tienen un aumento en los títulos de anticuerpos después de una vacunación de refuerzo si los títulos de anticuerpos contra la rubéola son indetectables o bajos, esto indica que fueron inmunológicamente estimulados por la infección o por la primera dosis de vacuna.^{24,32} No se observó una respuesta humoral de refuerzo en los participantes de nuestro estudio, a excepción de la persona con bajo nivel de anticuerpos. Este patrón se puede explicar por la interferencia del alto nivel de anticuerpos de rubéola preexistentes con la respuesta de refuerzo humoral secundaria en aquellos que no se observó aumento de anticuerpos. La inmunización contra la rubéola probablemente no aumenta el título de anticuerpos contra la rubéola en quienes son seropositivos debido a la inmunidad adquirida naturalmente o a la vacunación previa y tienen títulos altos de anticuerpos.

Aunque a principios de los años setenta varios grupos demostraron que la respuesta inmune celular contra la rubéola juega un papel importante en la epidemiología de la enfermedad, los estudios sobre la respuesta inmune celular a la vacunación primaria o de refuerzo son limitados y no están bien caracterizados. En estos primeros informes, la respuesta inmune celular a la rubéola se detectó *in vivo* por ensayos de reacción de hipersensibilidad retardada³³ o *in vitro* por transformación de linfocitos,³⁴ inhibición de migración de macrófagos³⁵ y citotoxicidad.^{36,37} Un estudio³⁸ evaluó la inducción de respuesta celular con una metodología novedosa que mide diversos marcadores de superficie en un subconjunto de células T estimuladas con un antígeno viral, sin embargo, los autores concluyeron que "el papel de la inmunidad mediada por células en la rubéola no está claro".

La inmunidad celular a la rubéola probablemente desempeña un papel importante en la prevención de la reinfección por rubéola en individuos inmunes. Nuestra evaluación de las respuestas proliferativas de las células T específicas de la rubéola al antígeno de rubéola mostró respuestas positivas antes de la vacunación en la mayoría de los participantes.

La inmunidad mediada por células aumentó después de la vacunación en tres pacientes, a pesar de que los títulos de anticuerpos contra la rubéola no mostraron una respuesta secundaria. Estas observaciones sugieren que, en los adultos, la inmunidad celular puede aumentar después de una dosis de refuerzo de la vacuna contra rubéola, incluso en presencia de altos niveles de anticuerpos específicos, a diferencia de otros autores que han encontrado una respuesta celular en ausencia de anticuerpos detectables.^{39,40} Sin embargo, no está bien definido cuál es el punto de corte

para considerar una respuesta inmune celular positiva, algunos trabajos consideran un índice de estimulación positivo si esto es >2 , pero otros consideran un $SI >3$.

No se sabe si la respuesta de las células T o la respuesta de anticuerpos es más importante en la protección a largo plazo.

Los dos participantes en nuestro grupo de estudio que tenían un título bajo de anticuerpos contra la rubéola desarrollaron una respuesta humoral significativa sin una respuesta de refuerzo celular cuantificable. Se ha reportado^{39,41} que el ensayo de linfoproliferación con ³H-timidina puede detectar entre 33 y 75% de las respuestas celulares, la falta de respuestas celulares en las dos personas seroconvertidas podría explicarse por las limitaciones de nuestro ensayo para detectar la respuesta mediada por células.

En este estudio se detectó una respuesta inmune celular de refuerzo con títulos protectores previos en ausencia de una respuesta humoral en tres participantes y seroconversión en las dos personas seronegativas en ausencia de una respuesta celular. En el 75% de los participantes con anticuerpos protectores no se observó respuesta inmune celular o humoral. La inmunización con rubéola en adultos sanos puede desarrollar una respuesta de refuerzo humoral o celular, específicamente en aquellos con bajos niveles de anticuerpos.

Conclusión

Los mecanismos para inducir la respuesta inmune celular y/o humoral de la vacunación contra rubéola son poco conocidos. En este estudio observamos que 55% de los adultos desarrollaron respuesta inmune tanto humoral como celular. Aunque la sensibilidad del ensayo de linfoproliferación quizá no es lo suficientemente alta como para detectar más de 75% de la respuesta celular que podría explicar la cifra de 55%, el 45% desarrolló exclusivamente una respuesta humoral. Nuestros datos sugieren una respuesta mixta, celular y humoral, contra rubéola después de la vacunación en 55% de la población, y sólo respuesta humoral en 45% de ésta.

Agradecimientos

Los autores deseamos mostrar nuestro agradecimiento a los participantes en este estudio.

Conflicto de intereses

Ningún autor tiene una asociación comercial o de otro tipo que pueda suponer un conflicto de intereses. Los autores declararon que no existe ningún conflicto de interés con respecto a la publicación de este documento. Este trabajo se realizó con un apoyo financiero del Centro Internacional Fogarty y la Oficina de Investigación sobre la Salud de la Mujer de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (TW006193) PI Rosa María Wong Chew.

El presente estudio se llevó a cabo en la Unidad de Investigación en Medicina Experimental, División de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Colonia Doctores, C.P. 06726, Ciudad de México.

Referencias

1. Banatvala, J.E. y Brown, D.W., "Rubella", *Lancet*, 2004, 363 (9415): 1127-1137.
2. Cutts, F.T., Robertson, S.E., Díaz-Ortega, J.L. y Samuel, R., "Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries, Part 1: Burden of disease from CRS", *Bulletin of the World Health Organization*, 1997, 75 (1): 55-68.
3. Mendis, L., "Susceptibility to rubella virus among Sri Lankan women", *The Ceylan Medical Journal*, 1989, 34 (2): 73-75.
4. Lee, J.Y. y Bowden, D.S., "Rubella virus replication and links to teratogenicity", *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13 (4): 571-587.
5. Salisbury, D.M. y Savingkh, A.L., "Rubella and congenital rubella syndrome in developing countries", EPI Global Advisory Group Meeting, Antalya, Turquía, 1991.
6. Robertson, S.E., Featherstone, D.A., Gacic-Dobo, M. y Hersh, B.S., "Rubella and congenital rubella syndrome: global update", *Revista Panamericana de Salud Pública*, 2003, 14 (5): 306-315.
7. O'Shea, S., Woodward, S., Best, J.M., Banatvala, J.E., Holzel, H. y Dudgeon, J.A., "Rubella vaccination: persistence of antibodies for 10-21 years", *Lancet*, 1988, 2 (8616): 909.
8. Reef, S.E., Frey, T.K., Theall, K., Abernathy, E., Burnett, C.L., Icenogle, J. *et al.*, "The changing epidemiology of rubella in the 1990s: on the verge of elimination and new challenges for control and prevention", *JAMA*, 2002, 287 (4): 464-472.
9. Spika, J.S., Wassilak, S., Pebody, R., Lipskaya, G., Deshevoi, S., Guris, D. *et al.*, "Measles and rubella in the World Health Organization European region: diversity creates challenges", *The Journal of Infectious Diseases*, 2003, 187 Suppl 1: S191-197.
10. World Health Organization, disponible en: http://apps.who.int/gho/data/view.main.1520_57.
11. National for Clinical Laboratory Standards, en NCCLS document 1/LAB-T, vol. 12, Villanova PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992, pp. 1-3.
12. Skendzel, L.P., "Rubella immunity. Defining the level of protective antibody", *American Journal of Clinical Pathology*, 1996, 106 (2): 170-174.
13. Steele, R.W., Hensen, S.A., Vincent, M.M., Fuccillo, D.A. y Bellanti, J.A., "Development of specific cellular and humoral immune responses in children immunized with live rubella virus vaccine", *The Journal of Infectious Diseases*, 1974, 130 (5): 449-453.
14. Vesikari, T. y Buimovici-Klein, E., "Lymphocyte responses to rubella antigen and phytohemagglutinin after administration of the RA 27/3 strain of live attenuated rubella vaccine", *Infection and Immunity*, 1975, 11 (4): 748-753.
15. Lalla, M., Vesikari, T. y Virolainen, M., "Lymphoblast proliferation and humoral antibody response after rubella vaccination", *Clin Exp Immunol*, 1973, 15 (2): 193-202.
16. Mitchell, L.A., Ho, M.K., Rogers, J.E., Tingle, A.J., Marusyk, R.G., Weber, J.M. *et al.*, "Rubella reimmunization: comparative analysis of the immunoglobulin G response to rubella virus vaccine in previously seronegative and seropositive individuals", *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34 (9): 2210-2218.
17. Rossier, E., Phipps, P.H., Polley, J.R. y Webb, T., "Absence of cell-mediated immunity to rubella virus 5 years after rubella vaccination", *Canadian Medical Association Journal*, 1977, 116 (5): 481-484.
18. Díaz-Ortega, J.L., Meneses-Reyes, C.D. y Palacios-Martínez, M., "Incidencia y patrones de transmisión de rubéola en México", *Salud Pública Mex*, 2007, 49 (5): 337-344.
19. Kim, A.J. y Roses, P.M., "Elimination of rubella and congenital rubella syndrome in the Americas: another opportunity to address inequalities in health", *Pan Am J Public Health*, 2004, 15: 145-146.
20. Consejo Nacional de Vacunación, *Manual de procedimientos técnicos de vacunación*, actualización 2003, Secretaría de Salud, México.
21. Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2002, para prevención y control de enfermedades, aplicación de vacunas, toxoides, sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas en el humano, *Diario Oficial de la Federación*, México, 2001.
22. CENAVECE, Anuarios estadísticos DGAE, Sistema especial EPV, 2007.
23. Dirección General de Epidemiología, *Anuario de Morbilidad Nacional*, 2017, disponible en: www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_nacional.html. Consultado: febrero de 2018.
24. Tischer, A. y Gerike, E., "Immune response after primary and re-vaccination with different combined vaccines against measles, mumps, rubella", *Vaccine*, 2000, 18 (14): 1382-1392.
25. Johnson, C.E., Kumar, M.L., Whitwell, J.K., Staehle, B.O., Rome, L.P., Dinakar, C. *et al.*, "Antibody persistence after primary measles-mumps-rubella vaccine and response to a second dose given at four to six vs. eleven to thirteen years", *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 1996, 15 (8): 687-692.
26. Schwarzer, S., Reibel, S., Lang, A.B., Struck, M.M., Finkel, B., Gerike, E. *et al.*, "Safety and characterization of the immune response engendered by two combined measles, mumps and rubella vaccines", *Vaccine*, 1998, 16 (2-3): 298-304.
27. Schuster, V., Otto, W., Maurer, L., Tcherepnine, P., Pfletschinger, U., Kindler, K. *et al.*, "Immunogenicity and safety assessments after one and two doses of a refrigerator-stable tetravalent measles-mumps-rubella-varicella vaccine in healthy children during the second year of life", *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2008, 27 (8): 724-730.
28. Fernández de Castro, B.J., Rincón Gallardo, H., Álvarez y Muñoz, M.T., Partida Sánchez, L.A.E. y Santos, J.I., "Evaluation of immunogenicity and side effects of triple viral vaccine (MMR) in adults, given by two routes: subcutaneous and respiratory (aerosol)", *Vaccine*, 2005, 23: 1079-1084.
29. Hillary, I.B. y Griffith, A.H., "Persistence of rubella antibodies 15 years after subcutaneous administration of Wistar 27/3 strain live attenuated rubella virus vaccine", *Vaccine*, 1984, 2 (4): 274-276.
30. Macías-Hernández, A.E., Ponce de León, S., Muñoz-Barrett, J.M., López-Jiménez, F., Cano-Castro, A., Vera-Pena, A. *et al.*, "The seroepidemiology of rubella in

- a female population of reproductive age in Leon, Guanajuato", *Salud Pública de México*, 1993, 35 (4): 339-344.
31. Villaseñor-Sierra, A., Santos-Preciado, J.I., Álvarez-Muñoz, M.T., Rivas-García, M.E., Martínez-Sandoval, F. y Falcón-Franco, M.A., "Antibody development and frequency of events temporarily associated with measles and rubella vaccines among university health personnel in Jalisco", *Gac Med Mex*, 2005, 141 (6): 455-459.
 32. Sepúlveda-Amor, J., Valdespino-Gómez, J.L., García-García, M.L., Bennett, J., Islas-Romero, R., Echániz-Avilés, G. *et al.*, "A randomized trial demonstrating successful boosting responses following simultaneous aerosols of measles and rubella (MR) vaccines in school age children", *Vaccine*, 2002, 20 (21-22): 2790-2795.
 33. Kauffman, C.A., Phair, J.P., Linnemann, C.C., Jr. y Schiff, G.M., "Cell-mediated immunity in humans during viral infection. I. Effect of rubella on dermal hypersensitivity, phytohemagglutinin response, and τ lymphocyte numbers", *Infection and Immunity*, 1974, 10 (1): 212-215.
 34. Morag, A., Morag, B., Bernstein, J.M., Beutner, K. y Ogra, P.L., "In vitro correlates of cell-mediated immunity in human tonsils after natural or induced rubella virus infection", *The Journal of Infectious Diseases*, 1975, 131 (4): 409-416.
 35. Honeyman, M.C., Forrest, J.M. y Dorman, D.C., "Cell-mediated immune response following natural rubella and rubella vaccination", *Clinical and Experimental Immunology*, 1974, 17 (4): 665-671.
 36. Kanra, G.Y. y Vesikari, T., "Cytotoxic activity against rubella-infected cells in the supernatants of human lymphocyte cultures stimulated by rubella virus", *Clin Exp Immunol*, 1975, 19 (1): 17-32.
 37. Vesikari, T., Kanra, G.Y., Buimovici-Klein, E., y Cooper, L.Z., "Cell-mediated immunity in rubella assayed by cytotoxicity of supernatants from rubella virus-stimulated human lymphocyte cultures", *Clin Exp Immunol*, 1975, 19 (1): 33-43.
 38. Toyoda, M., Ihara, T., Nakano, T., Ito, M. y Kamiya, H., "Expression of interleukin-2 receptor alpha and CD45RO antigen on τ lymphocytes cultured with rubella virus antigen, compared with humoral immunity in rubella vaccinees", *Vaccine*, 1999, 17 (15-16): 2051-2058.
 39. Heigl, Z., Wasserman, J. y Forsgren, M., "In vitro lymphocyte reactivity to rubella antigen following vaccination", *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 1980, 12 (1): 13-20.
 40. Tingle, A.J., Chantler, J.K., Kettyls, G.D., Larke, R.P. y Schulzer, M., "Failed rubella immunization in adults: association with immunologic and virological abnormalities", *The Journal of Infectious Diseases*, 1985, 151 (2): 330-336.
 41. Mitchell, L.A., Tingle, A.J., Decarie, D. y Shukin, R., "Identification of rubella virus τ -cell epitopes recognized in anamnestic response to RA 27/3 vaccine: associations with boost in neutralizing antibody titer", *Vaccine*, 1999, 17 (19): 2356-2365.