METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL ENSAYO DE POTENCIA DE LA VACUNA ANTIPERTUSSIS DE CÉLULAS COMPLETAS

✉ Esther M Fajardo, Yilian Plascencia, Adelina Chávez, Xenia Muñoz, Regla Sosa, Eduardo Álvarez e Iyalili Labrador

Instituto Finlay, Ave. 27 No. 19805, AP 16017, CP 11600, La Lisa, La Habana, Cuba. Tel.: (53-7) 21 4635; Fax: (53-7) 33 6075; E-mail: efajardo@finlay.edu.cu

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) Requirements for the whole-cell pertussis vaccine describe the potency test in a very general manner because it varies from one laboratory to another; one of the reasons for that variation could be the mouse strain used, therefore every laboratory shall evaluate the best conditions for its performance. To be considered valid, the effective dose 50 % (ED_{50}) value shall be between the largest and the smallest immunizing doses and the regression do not show significant deviations from linearity. The optimal dose range is experimentally determined in each laboratory. For the establishment of this assay in our laboratory the OF-1 mouse strain was used. Different immunizing doses were inoculated to get a surviving response which had to fulfil a linear regression analysis for be considered appropriate. Ten assays were performed following the same methodology. Six resulted valid. The logarithmic transformation of the doses used and their survival percent showed a good linear regression ($R \geq 0.99$) in the range of immunizing doses containing 2; 0.4 and 0.08 International Units (IU). Eight lots of Diphtheria-Tetanus-Pertussis (DTP) vaccine were also evaluated to prove that the potency test worked well. All the assays were valid according to WHO requirements. The methodology described in the present paper was considered appropriate to evaluate in our laboratory the potency of the whole-cell pertussis component in DTP vaccines.

Key words: pertussis vaccine, pertussis, potency, OF-1 mouse

Biotecnología Aplicada 1998;15:98-101

RESUMEN

Los requisitos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la vacuna antipertussis de células completas expresan de manera muy general la metodología para la ejecución del ensayo de potencia, ya que éste presenta variaciones de un laboratorio a otro debidas en parte a la cepa de ratón utilizada, por lo que cada institución debe establecerlo de acuerdo con sus condiciones. Para que sea válido, uno de los requisitos fundamentales a cumplir es que los animales tienen que presentar una sobrevivencia gradual de modo que el valor de la dosis eficaz 50 % (DE_{50}) se encuentre entre los por cientos mayores y menores de 50, en respuesta a las diferentes dosis inmunizantes; esto debe ajustarse a una regresión lineal. El valor de DE_{50} calculada debe estar entre las dosis inmunizantes mayor y menor. El rango óptimo de dosis donde ocurre esta respuesta se define experimentalmente en cada laboratorio. Para el establecimiento de este ensayo en nuestra institución se usó la cepa de ratón OF-1. Se realizaron diez ensayos siguiendo la misma metodología, de los cuales seis resultaron válidos. Al someter a un análisis de regresión lineal la transformación logarítmica de las dosis evaluadas con sus respectivos por cientos de sobrevivencia, se obtuvo que presentaron un ajuste apropiado ($R \geq 0{,}99$) en el intervalo de dosis inmunizantess que contenían 2; 0,4 y 0,08 Unidades Internacionales de protección. Se evaluaron además ocho lotes de vacuna Difteria-Tétanos-Pertussis (DTP) para comprobar el funcionamiento del ensayo, con resultados que cumplieron los criterios de validez de la OMS. La metodología empleada se consideró apropiada para evaluar en nuestro laboratorio la potencia del componente pertussis de células completas en vacunas DTP.

Palabras claves: vacuna antipertussis, pertussis, potencia, ratón OF-1

Introducción

La potencia de la vacuna antipertussis de células completas se determina mediante una prueba de protección activa que recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS) conocida como ensayo de protección con reto intracerebral en el ratón (1). En sus recomendaciones, la OMS propone de manera general el uso de como mínimo tres diluciones de una vacuna patrón de trabajo (evaluada por comparación con la Vacuna Patrón Internacional), paralelamente con igual número de la vacuna en estudio, con un factor de dilución no mayor que 5, con las que se inmunizan ratones de un mismo sexo o de ambos sexos repartidos igualmente en grupos de no menos que 16 animales con peso no inferior a 10 g ni

✉ Autor de correspondencia

1. Requirements for Pertussis Vaccine. WHO Technical Report Series 1990; 800:136-138.

mayor que 18 g, donde la diferéncia total en el grupo no debe diferir para un ensayo en más de 4 g; la inoculación es de 0,5 mL por vía intraperitoneal. Después de 14 días los animales se retan con una suspensión virulenta de *Bordetella pertussis* debidamente preparada y controlada para que contenga de 100 a 1 000 dosis letales 50 % (DL_{50}); el volumen de inoculación es de 0,03 mL y la vía es intracerebral. Los ratones se mantienen en observación durante 14 días más, durante los cuales se registran las muertes ocurridas y al final de ese tiempo se procede al cálculo de la potencia usando métodos estadísticos apropiados, que demuestren la linealidad de la respuesta de sobrevivencia de los animales en relación con las dosis de vacuna recibidas y además el paralelismo entre la respuesta de la vacuna en prueba con la del patrón. El método Probit es el más recomendado para estos fines (1, 2). El requisito mínimo para la vacuna en estudio es tener una potencia igual o superior a cuatro Unidades Internacionales (UI) de protección por dosis humana individual (0,5 mL) con un límite inferior para un intervalo de confianza de 95 % igual a 2 UI/dosis; este requisito ha sido corroborado en varios ensayos clínicos (3).

Las diluciones inmunizantes deben encontrarse en un intervalo tal que los animales después de retados con el germen virulento presenten una respuesta gradual de sobrevivencia, donde se obtengan por cientos superiores e inferiores a 50, los cuales permitan realizar los cálculos correspondientes, basados en la determinación de la dosis eficaz 50 % (DE_{50}), para los cuales es preciso que se puedan realizar transformaciones matemáticas apropiadas, de modo que la curva dosis-respuesta se ajuste a una regresión lineal. Este rango óptimo de diluciones se define experimentalmente en cada laboratorio.

En relación con los animales a utilizar, los documentos regulatorios de la OMS no proponen una cepa específica de ratón, sólo que deben ser animales sanos, susceptibles a la infección intracerebral por *B. pertussis* y capaces de dar una respuesta inmune adecuada, ya que se conoce que existen diferencias entre los laboratorios debidas en parte a los animales, como señala Pittman en un reporte al respecto (4). En estudios colaborativos donde se ha hecho uso de este ensayo, cada laboratorio lo ha efectuado de acuerdo con su metodología, la cual no contradice la establecida por OMS pero ha sido adaptada a las condiciones locales (5, 6).

En el continente americano, específicamente en los Estados Unidos (7), se usa la cepa de ratón N:NIH (SW) conocida también como NIH B x S, al igual que en México (Gallegos G. Laboratorio Nacional de Salud Pública. Comunicación personal, 1995) y Venezuela (Hurtado E. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Comunicación personal, 1995), no así en Chile (Johnson E. Instituto de Salud pública. Comunicación personal, 1995), donde es CF-1; en Hungría se usaba la CFW (Csizer Z. Instituto Human. Comunicación personal, 1977). En Cuba no se dispone de estos animales.

El objetivo del presente trabajo fue establecer la metodología para determinar el rango óptimo de dosis inmunizantes con el uso de la cepa de ratón OF-1 para el establecimiento en el laboratorio del ensayo de potencia de la vacuna antipertussis.

Materiales y Métodos

Animales

Ratones, cepa OF-1, no consanguínea (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB, Cuba), de 11 a 14 g de peso, de un mismo sexo.

Vacuna antipertussis de células completas

Vacuna Antipertussis Patrón Nacional de México, Lote VP-01, liofilizada, con 18 UI/mL después de reconstituida con solución de NaCl 0,85 %. Para corroborar el funcionamiento de la metodología del ensayo se usaron cuatro lotes de vacunas Difteria-Tétanos-Pertussis (DTP) nacionales (experimentales, Instituto "Finlay") y de importación (diferentes proveedores) respectivamente.

Medio de cultivo

Agar Base de Bordet-Gengou (BIOLIFE, Italia), preparado según instrucciones del fabricante, con adición de sangre desfibrinada de carnero, 20 % de concentración final.

Soluciones

Casaminoácidos 1 % - NaCl 0.6 %, pH 7 a 7.2 y NaCl 0,85 %.

Cepa de reto de *B. pertussis*

Cepa 18323 (Aglutinógenos 1, 2, y 3), liofilizada, lote semilla de trabajo código 1311 (Colección del Instituto "Finlay").

Ensayo de potencia

Para establecer el rango óptimo de diluciones inmunizantes. Se realizó como recomienda la OMS (1). La vacuna se reconstituyó con solución de NaCl 0,85 % según instrucciones y se diluyó con lo mismo para que tuviera 8 UI/mL. A partir de ésta se realizaron cuatro diluciones seriadas, con factor de 5, de modo que se obtuvieran 2; 0,4; 0,08 y 0,016 UI/0,5 mL, las cuales fueron inoculadas en grupos de 20 ratones, respectivamente, con dosis de 0,5 mL vía intraperitoneal. Se separaron cuatro grupos de 16 animales como controles; 14 días después los ratones inmunizados se retaron con 0,03 mL por vía intracerebral con una dilución apropiada de un cultivo de 18 a 20 h de *B. pertussis*,

2. Finney DJ. Parallel line assays. Finney DJ ed. Statistical Methods in Biological Assay. London: Charles Griffin and Company Limited 1971:100-117.

3. Galazka AM. The immunological basis for immunization series. Module 4: Pertussis. WHO/EPI/GEN/93.14:11-12.

4. Pittman M. Mouse strain variation in response to pertussis vaccine and tetanus toxoid. Internat Symp on Laboratory Animals, London 1966. En: Symp Series Immunobiol. Standard 1967; Vol. 5:161-166, Karger, Basel/New York.

5. Seagroatt V, Sheffield F. A collaborative assay of the proposed Second International Standard for Pertussis Vaccine and of the proposed First British Standard for Pertussis Vaccine. J of Biol Stand 1981;9:351-365.

6. Redhead K, Gaines Das RE. A collaborative assay of the proposed Third British Reference Preparation for Pertussis Vaccine and of the relative potencies of the Second International Standard and the Second British Reference Preparation for pertussis vaccine. Biologicals 1991; 19:107-111

7. USA. Division of Bacterial Products, Bureau of Biologics, FDA. Pertussis Vaccine Potency Assay 1978 Details 1.7 Mice.

crecido en medio de Bordet-Gengou, correspondiente a un segundo pase (en el mismo medio) del cultivo obtenido a partir del ámpula de la cepa liofilizada. Estos 0,03 mL constituyeron la dosis de reto, que contenía entre 100 y 1 000 DL_{50}. Un grupo de animales controles fue inoculado también con esta dilución, de la cual se prepararon otras (1:50; 1:250 y 1:1250) para evaluar la DL_{50}, que se inocularon respectivamente a los tres grupos restantes de animales controles. El diluente en todos los casos fue solución de casaminoácidos. Los ratones se observaron diariamente durante los 14 días posteriores al reto y se anotaron las muertes ocurridas; los que presentaron síntomas al final del ensayo se consideraron como muertos. Se calculó el por ciento de sobrevivencia para cada dosis de vacuna. La DL_{50} de la cepa se evaluó por el método de Reed-Muench (8). La DE_{50} de la vacuna y sus límites para una desviación estándar (DE) se calcularon por el método de Wilson-Worcester (9). Para controlar las bacterias viables se sembraron placas de Bordet-Gengou con la dilución $10^{-3,3}$ de la dilución de reto, 10^{-2} de 1:50, 10^{-1} de 1:250 y $10^{-0,3}$ de 1:1250, 3 placas por cada dilución con 0,1 mL en cada una; el inóculo se extendió con espátula para poder realizar el conteo de las colonias aisladas, 72 h después de incubarse a 35 °C. Se realizaron diez ensayos en días diferentes, siguiendo la misma metodología. Se siguió el criterio de la OMS (1) para decidir la validez de los mismos.

Para comprobar el funcionamiento de la metodología empleada. Se evaluó la potencia del componente pertussis de ocho lotes de vacuna DTP usando la metodología descrita, después de haber demostrado que las diluciones de la vacuna patrón empleadas con sus respectivas sobrevivencias de animales se ajustaban a una regresión lineal. Las diluciones de trabajo para las vacunas en estudio debían ser equivalentes a las del patrón. Para ello se tomó el criterio de que si la potencia mínima requerida para una vacuna final era 4 UI/dosis, las diluciones de las muestras debían ser 1:2; 1:10; 1:50 y 1:250. Estas se realizaron con el mismo diluente descrito para el patrón.

Análisis de los resultados. Los resultados de los ensayos válidos se sometieron a un análisis de regresión lineal (programa computadorizado, Microsoft Excel), donde se relacionó la transformación logarítmica de las dosis inmunizantes (el valor de cada dosis multiplicado por 100 para eliminar números decimales) con sus respectivos por cientos de sobrevivencia. Se obtuvo la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión (R) para cada ensayo. La potencia de los lotes de vacuna DTP evaluados se calculó mediante el método Probit (2).

Resultados y Discusión

De los diez ensayos realizados para establecer el rango óptimo de diluciones, cuatro no cumplieron con el requisito de la dosis de reto (100-1 000 DL_{50}), debido a problemas iniciales con el ajuste de la suspensión virulenta, los cuales se resolvieron satisfactoriamente, de modo que los otros seis fueron válidos (Tabla 1). En todos los casos se obtuvo un ajuste apropiado a una regresión lineal, ya que el valor de R fue siempre mayor o igual que 0,99.

La Figura 1 muestra las rectas de regresión correspondientes a cada ensayo. Se observan sólo cinco líneas porque hay una superpuesta, debido a que se obtuvieron los mismos resultados en los ensayos 2 y 5.

8. Habel K. Habel test for potency. Annex: calculating 50 % end-point dilutions by the method of Reed and Muench. Meslin FX, Kaplan MM and Koprowski H, eds. Laboratory Techniques in Rabies, 4th Edit. Geneva: WHO 1996:371-372.

9. USA. Division of Bacterial Products, Bureau of Biologics, FDA. Memorandum: Application of Statistical Bioassay to Pertussis Vaccine Potency Testing, 2nd Revision1978.

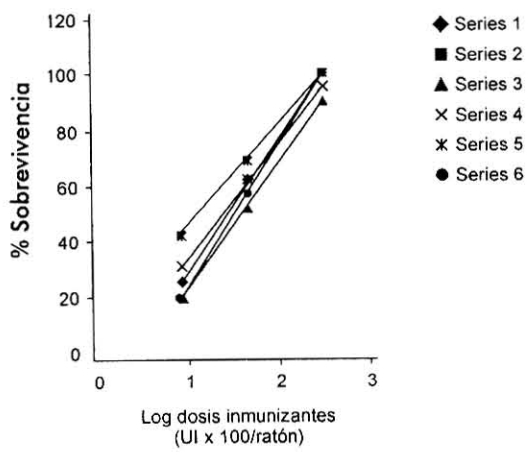

Figura 1. Rectas de regresión correspondientes a los ensayo de potencia de la vacuna antipertussis usando ratones OF-1.

Tabla 1. Resultados de ensayos de potencia de la Vacuna Pertussis Patrón usando la Cepa de Ratón OF-1.

Ensayo No.	Dosis inmunizantes (UI/ratón)	Sobrevivientes en las tres dosis (%)	DE_{50} (UI/ratón)	Ecuación de la recta de regresión	R	Límites para una desviación estándar* (%)
1	2 - 0,4 - 0,08	100-62,5-25	0,210	Y = 53,57X-23,21	1,0000	75 y 134
2	2 - 0,4 - 0,08	100-68,5-43,7	0,122	Y = 40,21X+6,39	0,9906	68 y 147
3	2 - 0,4 - 0,08	87,5-50-18,7	0,357	Y = 49,14X-26,6	0,9946	72 y 139
4	2 - 0,4 - 0,08	93,7-62,5-31,25	0,197	Y = 44,61X-8,89	1,0000	70 y 143
5	2 - 0,4 - 0,08	100-68,5-43,7	0,122	Y = 40,21X+6,39	0,9906	68 y 147
6	2 - 0,4 - 0,08	100-55-18,7	0,263	Y = 58,07 X-35,01	0,9924	77 y 131

* Límites máximos permitidos: 64 y 156 %.

En la Tabla 1 se muestran los límites (en por ciento) de la DE_{50} para una DE, obtenidos por el método de Wilson-Worcester, los cuales no son requisito de la OMS pero sí son de uso común en el continente americano (10). En todos los casos éstos se mantuvieron dentro de los límites máximos permitidos.

Aunque de los requisitos de la OMS (1) se deduce que el sexo no debe influir en los resultados y que se pueden usar animales de un sexo o de otro, o de ambos, pero repartidos por igual en el grupo, se decidió usar preferentemente las hembras, que fueron menos agresivas. Como el ensayo tiene una duración de 28 días, los ratones alcanzan gran desarrollo y se observó que cuando eran machos se peleaban frecuentemente, lo cual provocaba estados de tensión en el grupo, que podrían influir negativamente en los resultados. En los requisitos de Estados Unidos (7) para el ensayo de potencia de la vacuna antipertussis se especifica el uso de ratones hembras.

Los resultados obtenidos demostraron que la cepa de ratón OF-1 (CENPALAB) respondió adecuadamente en el ensayo de potencia de la vacuna antipertussis con una respuesta lineal en el intervalo de dosis inmunizantes con un contenido de 2; 0,4 y 0,08 UI y que la metodología empleada resultó ser apropiada para la evaluación de la potencia de vacunas con componente pertussis pues, como se puede observar en la Tabla 2, el rango de diluciones usado fue adecuado para ensayar productos con potencias altas y bajas. En el caso de los lotes experimentales nacionales la variabilidad observada era esperada, ya que se correspondían con diferentes variantes de formulación y en relación con los de importación, éstos provenían de diferentes casas comerciales. Hubo dos de ellos que no cumplieron el requisito mínimo de potencia (4 UI/dosis). La causa podría estar relacionada a fallos en la cadena de frío durante su transportación o almacenamiento, pero esto no pudo ser comprobado. Fue de gran utilidad la cuarta dilución (1:250 equivalente a 0,016 UI/dosis) en el caso de la muestra número cinco, ya que al ser tan potente, los por cientos de sobrevivencia mayores y menores de 50 se obtuvieron con las diluciones 1:10; 1:50 y 1:250 y fueron las escogidas para realizar los cálculos de la potencia. Se implementó por tanto el uso de cuatro diluciones como garantía de éxito del ensayo para el caso de vacunas con potencias mucho mayores que el requisito mínimo. Esto es importante si se tiene en cuenta que se necesita de un mes para obtener el resultado de la prueba y que las demoras debidas a ensayos no válidos son siempre muy perjudiciales para la producción.

La metodología empleada para el establecimiento del ensayo de potencia se consideró apropiada y se implantó en el laboratorio para realizar los análisis de rutina de las vacunas con componente pertussis de células completas.

Agradecimientos

Los autores agradecemos la gentileza de las doctoras Ofelia Saldate y Guadalupe Gallegos del Laboratorio Nacional de Salud Pública de México, D.F. por facilitarnos la Vacuna Antipertussis Patrón Nacional Lote VP-01 para la ejecución de este trabajo.

10. USA. Division of Bacterial Products, Bureau of Biologics, FDA. Bethesda, Maryland. Pertussis Vaccine Potency Assay 1978 Details. 7. Validity of test.

Tabla 2. Resultados de ensayos de potencia realizados al componente pertussis de diferentes muestras de vacunas DTP siguiendo la metodología descrita.*

Muestra	Potencia (UI/dosis)	Potencia límite inferior (UI/dosis)	Linealidad	Paralelismo	Cumplimiento del requisito OMS
1	5,40	2,20	Sí	Sí	Sí
2	3,20	1,40	Sí	Sí	No
3	1,21	0,39	Sí	Sí	No
4	8,50	3,90	Sí	Sí	Sí
5	24,40	11,24	Sí	Sí	Sí
6	10,70	4,40	Sí	Sí	Sí
7	12,40	6,00	Sí	Sí	Sí
8	12,12	5,22	Sí	Sí	Sí

*Las primeras cuatro muestras corresponden a lotes de importación; las restantes son lotes experimentales nacionales.

Recibido en julio de 1997. Aprobado en enero de 1998.