

Vacunas antidiftérica-tetánica y antidiftérica-tetánica-pertussis: evaluación del producto final

Pablo González, Sonia Martínez, Juan C. Ramírez, Francisco Domínguez, Yohana Díaz, Ubel Ramírez, Esther M. Fajardo, Yanelis Herrera, Daniel Cardoso, Ana C. Puig, Marixa Hernández, Ainat Duarte, Angel L. Coto.

Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

El presente trabajo muestra los resultados satisfactorios obtenidos en la evaluación de tres lotes de las vacunas antidiftérica-tetánica (DT) y antidiftérica-tetánica-pertussis (DTP), según los requerimientos de calidad establecidos para el control de dichas vacunas. Aborda además, la introducción del SDS-PAGE y el Western blot para la evaluación cualitativa de la adsorción de los toxoides diftérico y tetánico al gel de hidróxido de aluminio utilizado como adyuvante, herramientas útiles en la corroboración de la adsorción. También se muestran los resultados de la evaluación de la identidad del componente pertussis en la vacuna DTP, a través de ensayos de microaglutinación con sueros policlonales específicos de los determinantes inmunogénicos más significativos de este microorganismo.

Palabras claves: DT, DTP, formulación, control de calidad, adsorción, identidad.

Introducción

El empleo de las vacunas antidiftérica-tetánica-pertussis (DTP) y antidiftérica-tetánica (DT) en los esquemas primarios de inmunización y en la dosis de refuerzo al comienzo de la edad escolar respectivamente, acumulan una experiencia de varias décadas. A partir del uso rutinario de estas vacunas, se ha observado una drástica disminución en la morbilidad y mortalidad por estas enfermedades; pero a pesar de esto, continúan siendo estas tres enfermedades serios problemas de salud en el mundo subdesarrollado, con escasas perspectivas de erradicación en los próximos años (1).

El mejoramiento y caracterización de los componentes de estas vacunas, han sido nuevas estrategias recomendadas por la OPS, para garantizar preparados más seguros y eficaces. A esto se suma la propuesta de la utilización de la vacuna DTP, como soporte para nuevas formulaciones vacunales que incluyan antígenos contra otras enfermedades inmunoprevenibles (2). Abordar una mejor caracterización del evento de formulación de dichas vacunas permite no sólo enfrentar estos nuevos retos, sino además aportar nuevos elementos en la evaluación de la calidad de ellas.

La evaluación de la adsorción de los toxoides diftérico y tetánico al hidróxido de aluminio utilizado como adyuvante y la corroboración de la presencia de los antígenos protectores del componente de células enteras inactivadas de *Bordetella pertussis* en la vacuna DTP, constituyen elementos emergentes en la evaluación de dichas formulaciones.

Materiales y métodos

Formulación: Se formularon tres graneles de cada una de las vacunas, para lo cual se emplearon lotes diferentes de cada una de las materias primas activas: anatoxina tetánica (020/97, 021/97 y 022/97), anatoxina diftérica (02/97, 05/97, 09/97, 01/97, 07/97 y 016/97) y los concentrados de células inactivadas de *B. pertussis* (E1/97, E2/97 y E3/97). Todos los lotes de los tres principios activos habían sido liberados para su uso por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del Instituto Finlay.

La composición de la dosis en las vacunas finales fue de 50 Lf/mL de toxoide diftérico y 20 Lf/mL de toxoide tetánico para ambas vacunas, mientras que para la vacuna DTP se adicionó 32 UO/mL del componente pertussis. Los antígenos fueron adyuvados en gel de hidróxido de aluminio (Alhydrogel Superfos, Denmark) a una concentración final de 2 mg/mL. La vacuna DT llevó como excipiente solución salina 0,85% y la vacuna DTP buffer fosfato 4 mM, Na Cl 0,15 M, pH 6,8. A ambas vacunas se le adicionó tiomersal 0,01% v/v.

Control final de los graneles de vacunas DTP y DT adyuvadas: Se realizaron los ensayos de esterilidad, identidad, toxicidad específica, potencia, determinación de pH, tiomersal e hidróxido de aluminio, según lo sugerido en los Requerimientos de la OMS para difteria, tétanos, pertussis y vacunas combinadas (3).

Preparación de las muestras: Se prepararon mezclas controles positivos a la concentración de la dosis de los procesos de los toxoides diftérico y tetánico empleados en la formulación de cada uno de los lotes de ambas vacunas.

Las vacunas fueron centrifugadas a 2 500 rpm por 1 hora, se colectó el sobrenadante para la evaluación de la fracción de antígenos no adsorbidos. El pellet se resuspendió al volumen inicial en buffer de formulación y se le añadió citrato de sodio 170 mM. Posterior a una incubación de 72 horas a 37 °C, las muestras fueron centrifugadas en iguales condiciones y el sobrenadante de la fracción adsorbida al gel fue ajustado nuevamente al volumen inicial de trabajo.

Evaluación de la adsorción por SDS-PAGE: La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó según el método sugerido por Laemli en 1970 (4). Se utilizó un gel separador al 9% y un gel concentrador al 5%. Se tomó 1 mL de las muestras y se precipitó con 2 mL de ácido tricloroacético al 4%, el precipitado fue resuspendido en 200 µL de buffer TRIS-HCl 0,5 M, pH 6,8; se tomaron 20 µL de cada muestra y se diluyó en 10 mL del mismo buffer. Previo a la aplicación las muestras fueron calentadas a 100 °C por 5 minutos. La corrida se realizó a 200 V, 35 mA y 60 watt durante una hora. Para la corrida electroforética se usaron patrones de peso molecular en un rango de 53-212 Kda provenientes de Pharmacia, Suecia.

Evaluación por Western blot: Los SDS-PAGE obtenidos fueron transferidos a una celda de transferencia electroforética Mini Trans-Blot de BioRad, a membrana de nitrocelulosa en presencia de buffer TRIS-Glicina Metanol, pH 8.3 por espacio de 2 horas a 4 °C y 300 mA. Posteriormente se realizó un bloqueo con leche descremada al 3% más tiomersal 0,01% v/v por una hora, se lavó con PBS-Twen 20 al 0,1%. El suero diluido con leche descremada a 1/200 se incubó toda la noche. Se añadió el conjugado αIgG de conejo-peroxidasa durante 2 horas, se lavó la membrana transferida y se expuso por 10 minutos al sustrato diamino bencidina en PBS-H₂O₂. Finalmente se detuvo la reacción con abundante agua destilada.

Microaglutinación con sueros específicos: Se utilizaron sueros específicos contra toxina pertussis (TP), hemaglutinina filamentosa (HaF) y Pertactin (P), obtenidos en el laboratorio, previa inmunización de conejos con los antígenos purificados. Las muestras de células de pertussis procedían de las fracciones desadsorbidas de las vacunas, ajustadas a una DO₅₃₀ = 1,5, de las que se tomaron 50 µL y se enfrentaron, en placas de fondo U (Nunc Maxisort) a diluciones seriadas con factor de 2 de los sueros específicos previamente diluidos 1:4. Se incubaron las placas 24 horas a 37 °C en cámara húmeda. Se consideró el último pocillo con aglutinación positiva, aquel en que se formó la red de aglutinación. Se incorporó un control negativo sin adición de suero.

Resultados y discusión

Las tecnologías empleadas en la formulación de estas vacunas son poco tratadas en la literatura y durante años

las evidencias de su efectividad sobre la epidemiología de estas enfermedades parecen haber incidido en este silencio tan prolongado. Sin embargo, abordar este tema en estos momentos, impone una mejor caracterización físico, química y bioquímica de la formulación.

Los tres lotes de cada una de las vacunas fueron sometidos a los ensayos de control de calidad en este estadio productivo, realizados por la Dirección de Calidad del Instituto Finlay. La Tabla 1 reúne los resultados de dichos ensayos.

En los ensayos químicos practicados a cada una de las vacunas, se pudo observar que el tiomersal, para todos los casos se hallaba dentro del rango de aceptación establecido. El pH fue eficazmente controlado por la solución tampón en caso de la vacuna DTP, no así para la DT, donde fue necesario el ajuste puntual durante la formulación; el lote DT 8003 sobrepasó en 0,1 unidad los límites establecidos. Es aconsejable, para el control de este ensayo, estudiar un cambio de la solución tampón, similar al usado en la vacuna DTP. La concentración de gel de hidróxido de aluminio fue inferior o igual a 2,4 mg/mL en todos los casos.

Todos los lotes pasaron satisfactoriamente el ensayo de esterilidad, así como la identidad de cada una de las materias primas presentes en las formulaciones.

Los ensayos biológicos mostraron la seguridad de las vacunas, al no reportarse presencia de toxicidad específica para ninguno de los componentes; mientras que en el ensayo de potencia se evidenció la protección que garantizan cada uno de ellos en modelos animales. El componente tetánico de todos los lotes sobrepasó ampliamente las 10 UI/mL establecidas como criterio de aceptabilidad. Los títulos de anticuerpos antidiftéricos que garantizaron todos los lotes estuvieron por encima de las 5 UI/mL establecidos, aunque para varios graneles los títulos estuvieron muy cercanos al mínimo de aceptabilidad. Es ampliamente conocido que el toxoide diftérico es mucho menos inmunogénico que el toxoide tetánico. El toxoide diftérico es sustancialmente una molécula más pequeña que el toxoide tetánico y estudios de localización epitópica han mostrado que el mayor epítotope protector es discontinuo y pequeño en extensión, de ahí que sea más susceptible a ser dañado o enmascarado durante los eventos tecnológicos (5), principalmente en la destoxificación y por tanto sea menos competitivo a la hora de ser presentado a las moléculas MHC clase II (6). Es esta una de las razones que se tienen en cuenta para concederle el primer lugar en la adyuvación y así ayudar a la potenciación de la respuesta inmune. La potencia del componente pertussis se realizó mediante reto intracerebral a ratones previamente inmunizados con las vacunas DTP. Los tres lotes tuvieron potencias superiores a las 4 UI/dosis establecidas como criterio de aceptación.

Tabla 1. Resultados de los ensayos de control aplicados a los graneles de vacunas adsorbidas de DTP y DT

Ensayos	Criterio de aceptación	DTP 8001	DTP 8002	DTP 8003	DT 8001	DT 8002	DT 8003
pH	6,0-7,0	6,8	6,8	6,8	6,8	7,0	7,1
Al (OH) ₃	≤2.4 mg/mL	2,2	2,2	2,0	2,4	2,1	2,0
Tiomersal	0,05-0,2 mg/mL	0,10	0,10	0,11	0,11	0,09	0,11
Esterilidad	Estéril	Estéril	Estéril	Estéril	Estéril	Estéril	Estéril
Identidad							
Difteria	40-60 Lf/mL	50	50	50	50	50	50
Tétanos	16-24 Lf/mL	20	20	20	20	20	20
Pertussis	Aglutinógenos 1, 2 y 3	S	S	S	-	-	-
Toxicidad esp.							
Difteria	Satisfactorio	S	S	S	S	S	S
Tétanos	Satisfactorio	S	S	S	S	S	S
Pertussis	% IPPI ≥ 60	81	83	85	-	-	-
Potencia							
Difteria	≥ 5 UI/mL	5,06	5,05	10,17	5,28	9,98	5,19
Tétanos	≥ 10 UI/mL	32	51	28	47	72	72
Pertussis	≥ 4 UI/mL	7,77	9,71	5,12	-	-	-

Leyenda: S: satisfactorio

% IPPI ≥ 60: Tanto por ciento de incremento de peso promedio individual, superior o igual al 60% del incremento del grupo control no inoculado

Evaluación de la adsorción por SDS-PAGE: Las muestras en estudio al ser corridas por SDS-PAGE sin condiciones reductoras, dieron los resultados que se muestran en la Figura 1 y la Figura 2, correspondientes a las vacunas DT y DTP respectivamente.

Como se puede observar en ambas corridas electroforéticas, se visualizan claramente las bandas gruesas y difusas características de los toxoides tetánico y diftérico, respectivamente. Las mismas coinciden en las fracciones adsorbidas y sus respectivos controles positivos, no observándose en los pocillos correspondientes a las fracciones no adsorbidas.

En la Figura 2, a diferencia de la correspondiente a la vacuna DT y al control positivo compuesto por los toxoides, se visualiza claramente un contaminante de bajo peso molecular cercano al frente de corrida, el mismo parece ser un contaminante que aporta el componente pertussis.

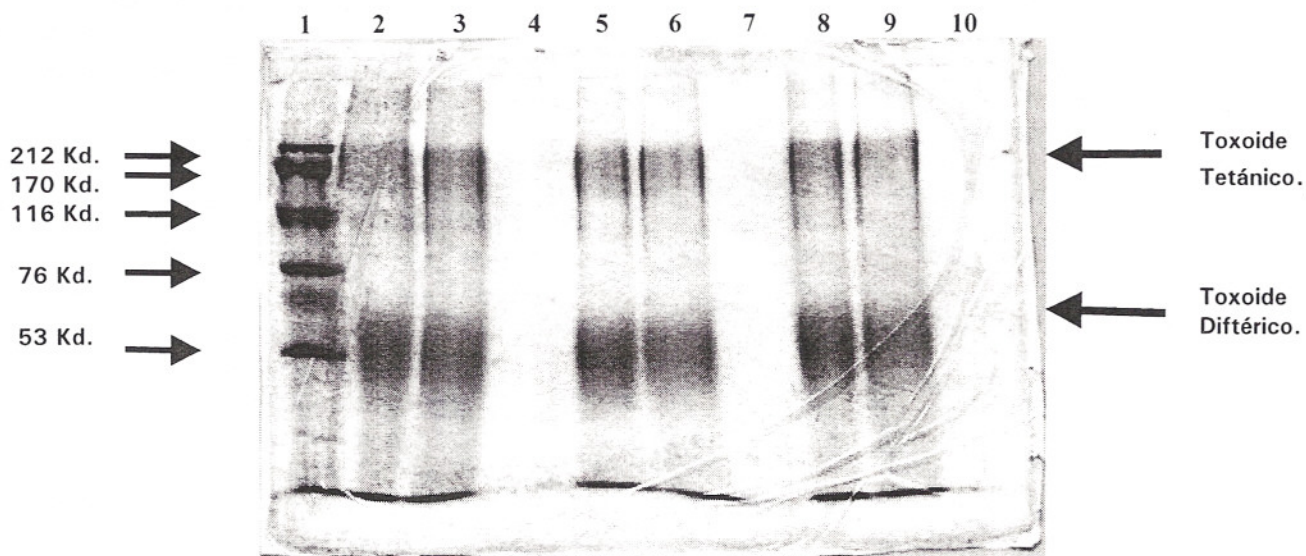
Evaluación de la adsorción por Western blot: La transferencia a membrana de nitrocelulosa de los SDS-PAGE, anteriormente obtenidos y el posterior enfrentamiento a anticuerpos antidiftéricos y antitetánicos, dieron como resultado el reconocimiento selectivo de cada uno de los antígenos contenidos en la vacuna. Las Figuras 3 y 4 demuestran lo anterior.

El reconocimiento del toxoide diftérico (Figura 3) fue evidentemente superior en la fracción adsorbida, sin embargo se visualiza el reconocimiento en las fracciones no adsorbidas de los tres lotes, pequeñas cantidades de este antígeno soluble. Resultados similares se obtuvieron en el reconocimiento del toxoide tetánico, aunque son menos intensas las fracciones no adsorbidas (Figura 4).

En los Western blot realizados a la vacuna DT, no se visualiza la presencia de los toxoides en las fracciones no adsorbidas (resultados no mostrados). Fueron detectadas una banda de alto peso molecular en el reconocimiento al toxoide diftérico y dos bandas de menor peso molecular que el toxoide tetánico en su correspondiente Western blot, lo cual pudiera ser producto del reconocimiento de los sueros policlonales a contaminantes residuales de los toxoides purificados. Sería aconsejable dilucidar posibles degradaciones o agregaciones de los toxoides.

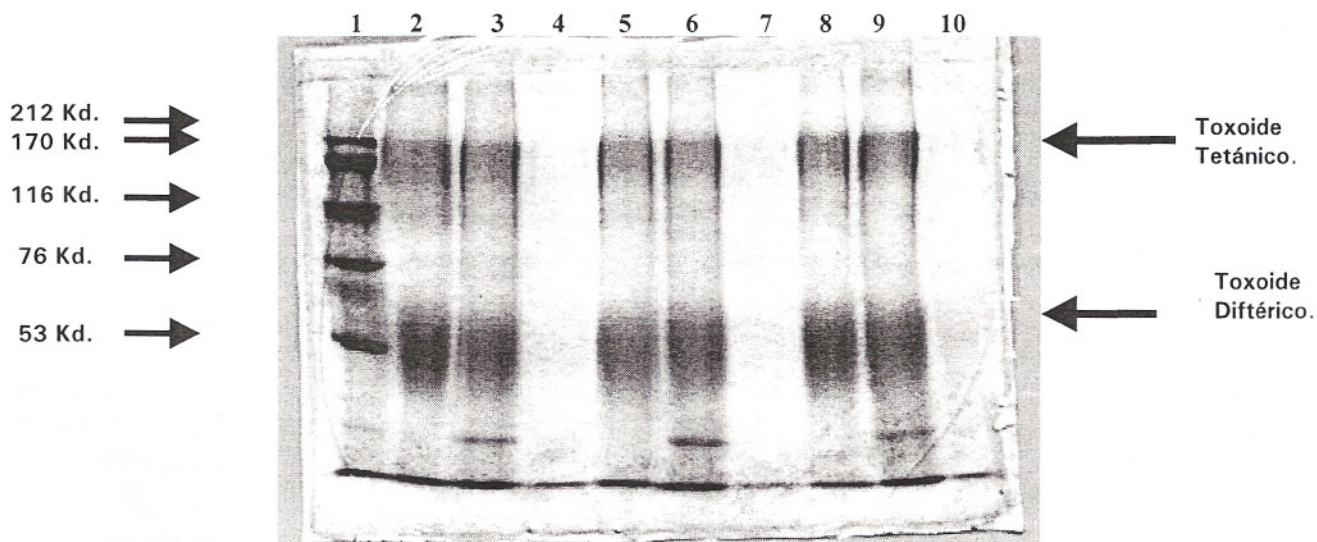
Ambas vacunas, sometidas a similares condiciones tecnológicas durante la adyuvación, difieren en los resultados de adsorción, esto hace pensar en el papel del componente pertussis en el desplazamiento de los toxoides de los sitios de adsorción en el gel, lo cual está considerado como uno de los problemas potenciales asociados a las vacunas combinadas (6).

Figura 1. Electroforesis en gels de poliacrilamida de las fracciones adsorbidas y no adsorbidas al gel de hidróxido de aluminio de los lotes de vacuna DT y sus respectivos controles



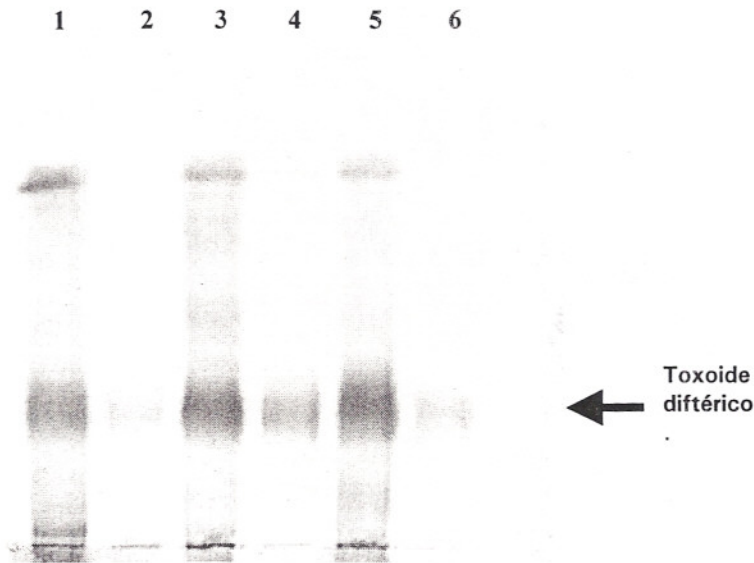
- Leyenda:**
- 1. Patrones de PM
 - 2,5,8. Controles positivos de los respectivos lotes de DT
 - 3,6,9. Fracción adsorbida de los lotes de DT 8001, 8002 y 8003
 - 4, 7,10. Fracciones no adsorbidas de los lotes de DT 8001, 8002 y 8003

Figura 2. Electroforesis en gels de poliacrilamida de las fracciones adsorbidas y no adsorbidas al gel de hidróxido de aluminio de los lotes de vacuna DTP y sus respectivos controles



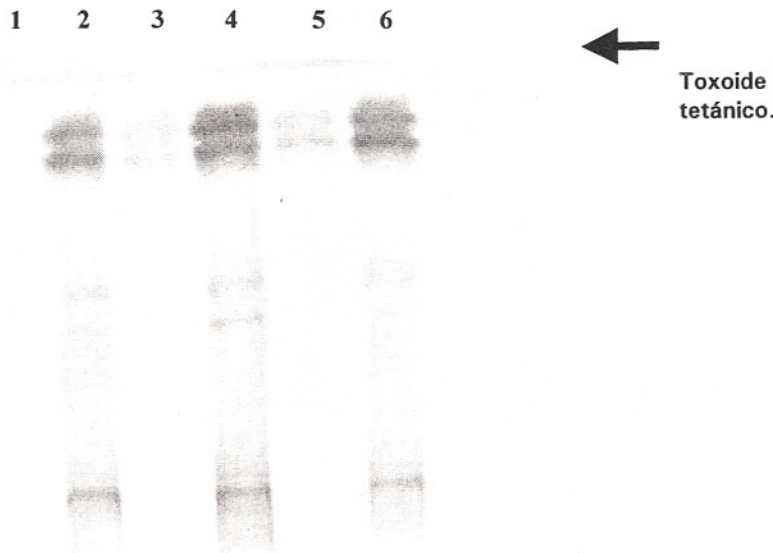
- Leyenda:**
- 1. Patrones de PM
 - 2,5,8. Controles positivos de los respectivos lotes de DTP
 - 3,6,9. Fracción adsorbida de los lotes de DTP 8001, 8002 y 8003
 - 4, 7,10. Fracciones no adsorbidas de los lotes de DTP 8001, 8002 y 8003

Figura 3. Transferencia electroforética de las fracciones adsorbidas y no adsorbidas al gel de hidróxido de aluminio de los lotes de vacuna DTP y detección inmuno-específica del toxoide diftérico



Leyenda: 1, 3 y 5: Fracción adsorbida al gel de $Al(OH)_3$
2, 4 y 6: Fracción no adsorbida al gel de $Al(OH)_3$.

Figura 4. Transferencia electroforética de las fracciones adsorbidas y no adsorbidas al gel de hidróxido de aluminio de los lotes de vacuna DTP y detección inmuno-específica del toxoide tetánico



Leyenda: 1, 3 y 5: Fracción no adsorbida al gel de $Al(OH)_3$
2, 4 y 6: Fracción adsorbida al gel de $Al(OH)_3$.

La sensibilidad de esta práctica, dada por la resolución que garantiza el inmuno-reconocimiento del antígeno, apuntalan esta técnica como válida para la evaluación cualitativa de la adsorción y para la caracterización de preparaciones vacunales. Es posible detectar por esta vía pequeñas concentraciones del antígeno que escapan a la detección en el SDS-PAGE con tinción con Coomassie.

Evaluación del componente pertussis en la vacuna DTP. Se plantea que el estadio virulento fase I de *Bordetella pertussis* promueve la expresión de todos los factores asociados a la virulencia (7). Para muchos de ellos se ha comprobado su participación en la inmunidad contra pertussis, por lo que la corroboración de su presencia en los preparados vacunales aporta un criterio valioso sobre la protección que pudieran brindar (8, 9). Dentro de estos factores asociados a la virulencia y con papeles importantes en la inmunidad, se encuentran: toxina pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactin o proteína de membrana externa de 69 Kda (P) y los aglutinógenos 1, 2 y 3.

Se corroboró por microaglutinación la presencia de los tres primeros antígenos citados. La toxina pertussis, en los tres lotes, tuvo una aglutinación positiva en la dilución 1:1024. La hemaglutinina filamentosa tuvo una respuesta positiva de 1:1024 para los lotes 8001 y 8003 y de 1:2028 para el 8002. El pertactin se identificó positivamente en diluciones de 1:4056 para los lotes 8001 y 8003 y una dilución de 1:2028 para el 8002. No se presenció aglutinación en los pocillos empleados como control negativo. La presencia de los aglutinógenos fue corroborada en los ensayos de identidad del componente pertussis, según las exigencias de calidad de la OMS para este componente vacunal (Tabla 1).

Uno de los conflictos comúnmente reportados en la variabilidad de este componente vacunal, es la influencia directa de la tecnología sobre la calidad del antígeno final. La misma debe garantizar una reducción significativa de la toxicidad inherente de este microorganismo, sin eliminar la presencia de los determinantes antigénicos de mayor impacto en la inmunogenicidad (8, 9).

La inclusión de este tipo de evaluación constituye un fuerte criterio de comprobación de la identidad y por ende de la calidad de este componente. Justamente el principio activo más vulnerable de la formulación de DTP es pertussis, no solamente por las complejidades tecnológicas para su obtención, sino además por las dificultades para evaluar individualmente a todos los componentes que participan en la inmunidad. Contar con estas evaluaciones adicionales caracteriza mejor al producto final.

Referencias

1. WHO. State of the world's vaccine and immunization. WHO/GPV/96.04.
2. OPS. Reunión sobre vacuna DTP mejorada y combinada basada en DTP. Informe final. OPS/HDP/HDR-RDV/HPM/EPI; 1993.
3. WHO. Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines. *WHO Technical Report Series*. 1990. No. 800, Annex 2. 1990:109-125.
4. Laemli V.K. *Nature*. 1970; Vol. 227:680-685.
5. Corbel M. Control testing of combined vaccines: A consideration of potential problems and approaches. *Biologicals*. 1994; Vol. 22, 353-360.

Conclusiones

Los resultados obtenidos reflejaron el cumplimiento satisfactorio de todos los controles de calidad establecidos para ambas vacunas. Además, incorporó una evaluación cualitativa de la adsorción de los toxoides como resultado del proceso de adyuvación durante la formulación. El seguimiento de este parámetro en estudios de estabilidad, pudiera aportar una mejor comprensión del comportamiento de la potencia de dichos componentes durante el período de almacenamiento, así como dar un criterio para la evaluación en el tiempo de la integridad molecular, siendo aconsejable la introducción de técnicas que permitan la cuantificación inicial de la adsorción. Además quedó demostrado la presencia en los concentrados celulares de pertussis, de todos los determinantes inmunogénicos, confirmando un poderoso argumento en la evaluación de la tecnología en la preservación de la antigenicidad.

6. Committee for proprietary medicinal products. Note for guidance on pharmaceutical and biological aspects of combined vaccines. The European Agency for the Evaluation of. 1997.
7. Medicinal Products. Human Medicines Evaluation Unit. CPMP/BWP. Vol. 477:1-14.
8. Weiss A. and S. Falkow. Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, 1984, Vol. 43: (1):263-269.
9. Weiss A. and E. Hemlett. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Ann. Rev. Microbiol.* 1986, Vol. 40, 661-686.
10. Pittman M. *Bordetella pertussis*-Bacterial and host factors in the pathogenesis and prevention of whooping cough. In: Mudd S, ed. *Infectious Agent and Host Reactions*. Philadelphia: WB Saunders Co. 1970 (11): 239-270.

Diphtheria-Tetanus and Diphtheria-Tetanus-Pertussis Vaccines Final Product Evaluation

Abstract

The present work shows the satisfactory results obtained in the evaluation of three lots of antidiphtheric-tetanus vaccine (DT) and antidiphtheric-tetanus-pertussis vaccine (DTP), in accordance with the quality control requirements established. The study also reports the introduction of SDS-PAGE and Western blot, useful tools in determining adsorption, for the qualitative evaluation of diphtheric and tetanus toxoid adsorption to the aluminum hydroxide used as adjuvant. Moreover, it presents the antigenicity results of the pertussis component in the DTP vaccine, by microagglutination assays with polyclonal sera specific for the most important immunogenic determinants of this microorganism.

Key words: DT, DTP, formulation, quality control, adsorption, identity.

Recibido: noviembre/98

Aprobado: enero/99