

Evaluación de dos métodos biológicos (Subcutáneo e Intradérmico) para detectar Toxina Diftérica

Esther María Fajardo, Eduardo Álvarez, Boris Ruiz, Pedro Muñoz.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana. Cuba.
E-mail: efajardo@finlay.edu.cu

Los Requisitos de la Organización Mundial de la Salud establecen los ensayos de toxicidad específica y reversión a la toxicidad de la anatoxina diftérica purificada como controles obligatorios del proceso productivo. El método propuesto para evaluar la toxicidad específica consiste en inocular curieles por vía subcutánea (método subcutáneo) con 1 mL del producto conteniendo 500 Lf/mL; señalan como posibles el ensayo en cultivos celulares y la inoculación intradérmica (método intradérmico) de 20 Lf en curieles o conejos. Para la reversión a la toxicidad no se propone un método determinado, sólo que debe aprobarlo la Autoridad Reguladora Nacional y ser suficientemente sensible para detectar pequeñas cantidades de toxina. Por la importancia de estos ensayos que garantizan la seguridad del producto, se evaluaron ambos métodos, fundamentalmente sobre la base de su límite de detección (empleando concentraciones conocidas de una toxina diftérica de referencia), pero también con relación al cumplimiento del principio ético de las "tres Erres" (Reemplazo, Reducción, Refinamiento) y el tiempo requerido para obtener resultados. El método intradérmico resultó más sensible que el subcutáneo (límite de detección de $0,0067 \times 10^{-4}$ Lf/mL vs $4,17 \times 10^{-4}$ Lf/mL), requiere menos animales (2 vs 5 por muestra), su punto final es una reacción local (eritema), sin muerte (cumple con 2 "Erres"), es más corto (48 h vs 6 semanas) y por tanto, más económico. Se recomienda realizar los estudios correspondientes para introducirlo en los ensayos rutinarios de toxicidad específica y reversión a la toxicidad de la anatoxina diftérica purificada obtenida en el Instituto Finlay.

Palabras clave: Difteria, Anatoxina, Toxicidad Específica, Reversión.

Introducción

La toxina diftérica obtenida por fermentación del *Corynebacterium diphtheriae* es una exotoxina muy potente con una dosis letal para humanos de 0,1 μ g/kg (1). Durante el proceso de producción ésta se concentra y posteriormente se destoxifica con agentes químicos (Ej. formaldehído) (2,3) para obtener toxoide o anatoxina diftérica purificada (ADP), que se utiliza en la formulación de las vacunas triple bacteriana Difteria-Tétanos-Pertussis y Difteria-Tétanos o Duple, más conocidas como DTP y DT (4). El componente diftérico de estas vacunas ha demostrado que estimula la inmunidad contra la enfermedad (5).

La destoxificación es un proceso muy importante, que debe ser rigurosamente controlado, ya que por sus características, puede quedar toxina sin destoxificar y lo peor, puede ocurrir reversión del toxoide hacia toxina, según lo reportado por algunos autores (6,7).

Por esta razón la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece en sus requisitos (4) el ensayo de toxicidad específica de la ADP para verificar la eficiencia de la destoxificación (no presencia de toxina), y el ensayo de reversión a la toxicidad, para comprobar que una vez diluida a la concentración en que se debe encontrar el componente diftérico en la vacuna final, no ocurre reversión a toxoide. El método recomendado en estos requisitos es la inoculación subcutánea (método subcutáneo) en curieles, aunque también se señala la posibilidad de emplear cultivos celulares (células Vero) o la inoculación por vía intradérmica (método intradérmico) en curieles o conejos. Para la reversión a la toxicidad no se propone un método determinado, sólo que debe aprobarlo la Autoridad Reguladora Nacional y ser suficientemente sensible para detectar pequeñas cantidades de toxina. El método que emplea células Vero es el más específico y sensible

reportado hasta el momento para detectar toxina diftérica (20 pg/mL); se encuentra en un orden de magnitud más sensible que el método intradérmico (8), pero no es accesible en nuestra institución en estos momentos. Sólo contamos con el método subcutáneo y el intradérmico, siendo el primero el que se ha usado desde el inicio de la producción hasta el momento actual para estos ensayos.

Por otra parte, en el mundo se tiende actualmente a disminuir el empleo de animales de laboratorio en los ensayos biológicos y muchas personas se pronuncian por la aplicación del concepto de las "3 Erres" (Reemplazo, Reducción y Refinamiento), que estimula el uso racional (Reducción) y ético (Refinamiento) de los animales, y su sustitución (Reemplazo) siempre que sea posible, por otros métodos que provean resultados confiables.

El objetivo del presente trabajo fue comparar los métodos subcutáneo e intradérmico para seleccionar el más apropiado, teniendo en cuenta fundamentalmente la capacidad de detección de toxina y también el concepto de las "3 Erres", con vistas a aplicarlo en la rutina de los ensayos de toxicidad específica y de reversión a la toxicidad de las ADP.

Materiales y Métodos

Animales. Curieles D. Hartley (CENPALAB, Cuba), de 300 ± 50 g para el método subcutáneo y de 600 ± 50 g para el método intradérmico.

Soluciones. Se empleó buffer de borato pH 8 (buffer Glenny) como diluyente de la toxina diftérica en todos los ensayos.

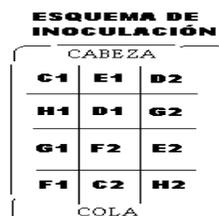
Materiales de referencia. Para evaluar el límite de detección de ambos métodos (subcutáneo e intradérmico), se empleó el Material de Referencia de Trabajo de Toxina Diftérica Lote TD(01)/1995 (Laboratorio de Materiales de Referencia, Dirección de la Calidad, Instituto Finlay, Cuba), liofilizado en volúmenes de 1 mL, 80 Lf/mL y contiene aproximadamente 30 mg de peso seco.

Métodos para detectar toxina diftérica. Se tomaron como base los métodos señalados por la OMS (4) para evaluar la toxicidad específica y la reversión a la toxicidad de la Anatoxina Diftérica Purificada, en lo que respecta a los volúmenes inoculados, las vías de inoculación, el tiempo de observación y el criterio de toxicidad, ya que en este caso se trabajó con toxina y no con el

producto destoxificado. A continuación se describe la metodología empleada en cada caso. Se realizaron un total de siete ensayos paralelos, en diferentes días, usando cada vez para ambos métodos, las mismas diluciones de toxina, recién preparadas. Como criterio de aceptación para el mejor método se escogió el que fuese capaz de detectar la menor concentración de toxina diftérica.

Método subcutáneo. Se prepararon cinco diluciones con factor 5 conteniendo diferentes concentraciones de toxina: A (78 125 ng/mL); B (15 625 ng/mL); C (3 125 ng/mL); D (625 ng/mL) y E (125 ng/mL). Cada dilución por separado se inoculó por vía subcutánea en cada uno de 2 curieles de 300 ± 50 g, en dosis de 1 mL (para evaluar las muestras de rutina se usan 5 curieles, que no eran necesarios en este caso, pues los síntomas debían ser bien evidentes). Los animales se observaron 6 semanas, durante las cuales se pesaron semanalmente, para detectar cualquier síntoma de intoxicación. Los que presentaron síntomas se sacrificaron para comprobar la intoxicación por toxina diftérica, observando la hipertrofia y hemorragia típicas de las glándulas suprarrenales. Al final del ensayo, todos los animales sobrevivientes se sometieron a autopsia y se observaron las glándulas suprarrenales. Como límite de detección del ensayo se tomó la mínima dosis evaluada de toxina que produjera síntomas típicos de intoxicación diftérica en los animales inoculados (muerte, pérdida de peso, glándulas suprarrenales alteradas) en como mínimo 3 ensayos consecutivos.

Método intradérmico. Las diluciones de la toxina de referencia que se prepararon el mismo día para el método subcutáneo se continuaron en este caso hasta las diluciones F (25 ng/mL), G (5 ng/mL) y H (1 ng/mL). Las diluciones desde la C hasta la H se inocularon paralelamente al ensayo subcutáneo. En este caso, la dosis fue de 0,2 mL por vía intradérmica, en la piel depilada de dos curieles de 600 ± 50 g, con el siguiente esquema:



Se realizaron dos réplicas de cada dilución (1 y 2) en cada curiel. De este modo, en 0,2 mL los animales recibieron las siguientes dosis de toxina diftérica, según la dilución: 625 ng (C), 125 ng (D); 25 ng (E); 5 ng (F); 1 ng (G) y 0,2 ng (H).

La observación se realizó a las 24 y 48 h posteriores a la inoculación. Los eritemas observados se midieron con un pie de rey y se anotaron los resultados. Para cada dilución se obtuvo el eritema promedio (en mm) de todos los puntos inoculados en ambos animales, en todos los ensayos realizados, aproximando al número entero. Como límite de detección del ensayo se consideró la mínima dosis que produjera a las 48 h un eritema característico (rojo) de 10 mm o mayor en como mínimo tres ensayos consecutivos.

Resultados y Discusión

Las Tablas 1 y 2 muestran el resumen de los siete ensayos realizados por ambos métodos. El límite de detección para el método subcutáneo en el rango de diluciones y con el factor empleado,

fue de 15 625 ng/mL (15,625 μ g/mL), equivalentes a $41,7 \times 10^{-3}$ Lf/mL, mientras que el método intradérmico detectó hasta 25 ng/mL de toxina (ó 5 ng/0,2 mL), equivalentes a $0,067 \times 10^{-3}$ Lf/mL, unas 600 veces más bajo, por tanto, es el método de elección en nuestras condiciones para detectar toxina. El método intradérmico es más sensible en un orden de sensibilidad con relación al subcutáneo, ya que detecta en el orden de nanogramos (ng), mientras que el subcutáneo detecta en el orden de microgramos (μ g). El límite de detección en el orden de ng obtenido para el método intradérmico coincide con lo reportado por otros autores (8).

Además, si se tienen en cuenta los aspectos éticos, este método consume menos animales (2 vs 5 por muestra) y su punto final es una reacción cutánea, en vez de la muerte, como es el caso del método subcutáneo, por lo que cumple con dos de las "3 Erres" (Reducción y Refinamiento). Como es mucho más corto (48 h vs 6 semanas), resulta también más económico.

Tabla 1. Método Subcutáneo. Respuestas de los curieles a las diferentes dosis de toxina diftérica en los siete ensayos realizados, medidas en función de la muerte o los síntomas de intoxicación diftérica durante el tiempo de observación (6 semanas ó 42 días)*.

Dilución	Dosis de toxina (Lf/mL)	Dosis de toxina (ng/mL)	Muertes o síntomas de los animales inoculados con toxina diftérica por el método subcutáneo en los siete ensayos realizados						
			1	2	3	4	5	6	7
A	208,3 x 10^{-3}	78 125	Síntomas 24 h	Síntomas 24 h	Síntomas 24 h	Síntomas 24 h	Síntomas 24 h	Síntomas 24 h	Síntomas 24 h
			Muertos 48 h	Muertos 48 h	Muertos 48 h	Muertos 48 h	Muertos 48 h	Muertos 48 h	Muertos 48 h
B	41,7 x 10^{-3}	15 625	Síntomas 24 y 48 h	Síntomas 24 y 48 h	Síntomas 24 y 48 h	Síntomas 24 y 48 h	Síntomas 24 y 48 h	Síntomas 24 y 48 h	Síntomas 24 y 48 h
			Muertos 72 h	Muertos 72 h	Muertos 72 h	Muertos 72 h	Muertos 72 h	Muertos 72 h	Muertos 72 h
C	8,3 x 10^{-3}	3 125	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días
D	1,7 x 10^{-3}	625	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días
E	0,34 x 10^{-3}	125	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días	Asintomático cos 42 días

*Los animales muertos o muy enfermos fueron autopsiados; las glándulas suprarrenales se presentaron hipertróficas y hemorrágicas. Todos los animales asintomáticos fueron autopsiados al final del ensayo y no mostraron alteraciones en sus glándulas suprarrenales.

Tabla 2. Método Intradérmico. Respuestas de los curieles a las diferentes dosis de toxina diftérica en los siete ensayos realizados, medidas en función de los diámetros (mm) de los eritemas típicos observados a las 48 h de la inoculación.*

Dilución	Dosis de toxina (Lf/mL)	Dosis de toxina (ng/mL)	Dosis de toxina (ng/curiel) (0,2 mL)	Diámetros de los eritemas (mm) correspondientes a cada dosis de toxina, obtenidos en los siete ensayos realizados							Eritema promedio (mm)
				1	2	3	4	5	6	7	
C	$8,3 \times 10^{-3}$	3125	625	29	28	26	25	26	25	26	26
D	$1,7 \times 10^{-3}$	625	125	21	20	20	17	21	20	19	19
E	$0,34 \times 10^{-3}$	125	25	17	16	6	16	18	15	16	16
F	$0,067 \times 10^{-3}$	25 5	5	14	14	13	13	15	12	12	13
G	$0,013 \times 10^{-3}$		1	0	0	0	0	0	0	0	0
H	$0,0027 \times 10^{-3}$	1	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0

* El valor del diámetro (mm) del eritema reportado por dosis en cada animal se corresponde con el promedio de los obtenidos en los dos sitios de inoculación (réplica 1 y réplica 2), aproximando al número entero.

Conclusiones

Como resultado de este estudio se concluye el método intradérmico presenta mejor límite de detección que el subcutáneo para detectar toxina diftérica ($0,067 \times 10^{-3}$ Lf/mL vs $41,7 \times 10^{-3}$ Lf/mL), es más corto (48 h vs 6 semanas) y requiere menos animales (2 curieles vs 5 por muestra), por lo que resulta mucho más económico y ético; cumple 2 de las 3 "Erres" (Reducción y Refinamiento). Por todo lo anterior, resulta idóneo para realizar los ensayos de toxicidad específica y reversión a la toxina y se recomienda realizar los estudios correspondientes para introducirlo en la rutina del control de la calidad de la Anatoxina Diftérica Purificada (ADP) que se produce en el Instituto Finlay.

Referencias

1. Pappenheimer AM. Diphtheria toxin. *Ann Rev Biochem*, 1977; 46:69-94.
2. Sinkovič D. Effect of formaldehyde on diphtheria toxin protein molecule. *Radovi Imunoloskog Zavoda-Zagreb*, 1975; XVIII:85-90.
3. Neumüller, C. Detoxification of Diphtheria Toxin with Formaldehyde mixed with an Amino-Acid. *Nature*, 1954; 174:405.
4. Requirements for Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines. WHO Technical Report Series, 1990; 800:87-108.
5. Global Programme for Vaccines and Immunization. *The immunological Basis for Immunization. Series. Module 2: Diphtheria*. 1993; WHO/GEN/93.12, WHO, Geneva.
6. Akama K, Kameyama S, Otani S, Sadahiro S, Murata R. Reversion to toxicity of diphtheria toxoid. *Jap J of Med Sci & Biology*, 1971; 24(3):183-187.
7. Kurokawa M, Murata R. On the toxicity of the "toxoid" preparation responsible for the Kyoto catastrophe in 1948. *J Med Sci Biol*, 1961; 14:249-256.
8. Hoy CS, Sesardic D. *In vitro* assays for detection of diphtheria toxin. *Toxic. in vitro*, 1994; 8(4):693-695.

Evaluation of two different Biological Methods (Subcutaneous and Intradermal) for detecting Diphtheria Toxin

Abstract

The World Health Organization Requirements establish tests to determine both specific toxicity and reversion to toxicity of the purified diphtheria anatoxin as mandatory controls for the production process. The proposed method to evaluate the specific toxicity consists in the subcutaneous inoculation (subcutaneous method) of Guinea pigs with 1 mL of the product containing 500 Lf/mL; other suggested possible methods are those using cell-cultures and the intradermal inoculation (intradermal method) of 20 Lf in Guinea pigs or rabbits. No specific method is proposed for the reversion to toxicity test; it only should be approved by the National Regulatory Authority and be sufficiently sensitive to detect small amounts of toxin. Due to the importance of those tests for supporting the safety of the product, both methods were evaluated, mainly in terms of their detection limits (by using known concentrations of a reference diphtheria toxin), but also related to the fulfilment of the ethical "3 Rs" principle (Replace, Reduction, Refinement) and the overall time required for the results. The intradermal method resulted more sensitive than the subcutaneous one (detection limit 0.0067×10^{-4} Lf/mL vs 4.17×10^{-4} Lf/mL), requires less animals (2 vs 5 per sample), its end-point is a local reaction (erythema) instead of death (meets 2 "Rs") and it is shorter in time (48 h vs 6) weeks and therefore more economic. It is recommended to carry out the corresponding studies for its introduction in the routine specific toxicity and reversion to toxicity tests performed on the purified diphtheria anatoxin produced at Finlay Institute.

Keywords: Diphtheria, Anatoxin, Specific Toxicity, Reversion.