

# Limitaciones del ensayo de toxicidad específica para el componente pertussis de células completas

Mario Landys Chovel<sup>1</sup>, Juan Miguel Figueroa<sup>2</sup>, Vicente Perdomo<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805 e/ 198 y 202. La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Calle 200, No 1706 entre 17 y 19, CP 11600, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

**Correo electrónico:** mlandys@finlay.edu.cu

Las vacunas que contienen células inactivadas de *Bordetella pertussis* se han utilizado con efectividad en los Programas Nacionales de Inmunización de todo el mundo. Pese a su reconocida eficacia, ellas se caracterizan por su elevada reactogenicidad, atribuible a la presencia de componentes como toxina pertussis y endotoxinas. Para monitorear la seguridad de estas vacunas existe el ensayo de ganancia en peso en ratones, el cual ha sido criticado por su inespecificidad, poca sensibilidad y alta variabilidad. Basado en lo anterior, el Laboratorio Nacional de Biológicos del Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos en Cuba, decidió evaluar la relevancia de esta prueba para la liberación de los lotes de la vacuna DPT. Para ello se estimó la sensibilidad del método para detectar diferentes concentraciones de endotoxinas y toxina pertussis, así como la variabilidad entre ensayos. Los resultados de este trabajo mostraron que sólo altas concentraciones de endotoxinas y toxina pertussis, muy superiores a las habituales en las vacunas DPT, provocan una disminución de la ganancia en peso promedio y un fallo en la especificación de la prueba. Este elemento y la inherente variabilidad de este método resultaron claves en la decisión de no utilizarlo para la liberación nacional de lotes de la vacuna DPT.

**Palabras clave:** Pertussis de células completas, ganancia en peso en ratones, limitaciones del método.

## Introducción

Las vacunas que contienen componente pertussis de células completas han sido utilizadas ampliamente como parte de las vacunas combinadas DPT (unido a los toxoides tetánico y diftérico) durante décadas. A pesar de su reactogenicidad y la aparición de eventos adversos posteriores a la inmunización, ellas continúan siendo producidas en todo el mundo debido a su efectividad en la prevención de la tos ferina. Es por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS) aún recomienda su inclusión en los programas nacionales de inmunización, independientemente del surgimiento de las vacunas acelulares, que son menos reactogénicas (1, 2).

La reactogenicidad de las vacunas de pertussis de células completas se debe a la acción de una serie de componentes presentes en el producto que ya ha sido inactivado, entre ellos la toxina pertussis y los lipooligosacáridos. Estos son ampliamente reconocidos como factores de patogenicidad de la bacteria *Bordetella pertussis*. La toxina pertussis (TxP) es una transferasa de grupos ADP-ribosilo, formada por dos componentes que comprenden seis subunidades formadas por cinco proteínas diferentes y cuyo sustrato específico es una secuencia de las proteínas G involucradas en la transducción de señales intracelulares. Ella produce efectos muy variados como secreción de insulina, bloqueo de receptores  $\beta$  adrenérgicos, sensibilización a la histamina, linfocitosis, mitogénesis, estimulación de melanocitos,

estimulación de linfocitos B y T, inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos y de la migración de monocitos. Está presente en cantidades variables en vacunas de pertussis de células completas, tanto en su forma activa como destoxificada, y se le atribuye el mayor aporte a la reactogenicidad de estas vacunas, incluyendo las neuropatologías (3-5). Entretanto, los lipooligosacáridos son de dos tipos: uno que contiene lípido A, oligosacárido y un trisacárido conformado por ácido N-acetil-glucosamina-2,3-dideoxi-2,3-di-N-acetil-manosaminurónico y N-acetil-N-metilfucosamina, mientras el otro sólo contiene lípido A y oligosacárido. Ambos poseen actividad de endotoxina, aunque de naturaleza diferente del lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, por lo que existen numerosos reportes que asocian la reactogenicidad de las vacunas de pertussis de células completas a su presencia o a su combinación con la toxina pertussis (6-8).

Hasta el momento el control de la toxicidad de vacunas de pertussis de células completas se realiza por el ensayo de ganancia en peso en ratones, que es el único especificado en los requerimientos de la OMS, la Farmacopea Europea y los Estados Unidos (1, 9-11). Está basado en una observación de Pittman, quien encontró en 1952 una correlación entre la toxicidad dermonecrótica de vacunas pertussis en conejos y la ganancia en peso en ratones. La determinación del peso en ratones demostró ser más reproducible que el ensayo en la piel de los conejos, razón por la cual el ensayo fue introducido por vez primera en los Estados Unidos (12).

Según este ensayo, las vacunas son consideradas no tóxicas si al tercer día de la inmunización el peso total de los ratones no es inferior al peso total inicial, si al séptimo día de tratamiento la ganancia en peso promedio de los ratones es al menos el 60% del grupo control (animales inoculados con solución salina) y si no más del 5% del total de ratones muere. Este es un ensayo que puede considerarse como una prueba de seguridad general, no específica, pues mide la toxicidad total tomando en cuenta que la ganancia en peso de los ratones puede afectarse por múltiples factores.

Si bien es cierto que se ha reportado correlación entre los resultados de este ensayo y la aparición de reacciones adversas en niños (13-15), ha sido fuertemente criticado por sus limitantes en términos de especificidad, sensibilidad y variabilidad, además de que se considera pobre en su capacidad para discriminar entre productos reactogénicos y no reactogénicos (16-17).

El Laboratorio Nacional de Biológicos del Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos en Cuba (CECMED), tiene como misión la realización de pruebas que garanticen la calidad, seguridad y eficacia de las vacunas y otros productos biológicos que son necesarios en la liberación nacional de lotes. Para ello el laboratorio debe disponer de métodos que resulten relevantes para determinar como mínimo la no toxicidad y la potencia/inmunogenicidad de cada lote de vacuna que se evalúe, y en caso de no obtener los resultados esperados con los métodos oficiales, desarrollar nuevas metodologías que aseguren el control sobre los productos que deben ser liberados.

Tomando en consideración estos antecedentes, el Laboratorio Nacional de Biológicos se propuso como objetivo fundamental en este trabajo evaluar la capacidad del ensayo de ganancia en peso en ratones para monitorear la toxicidad específica del componente pertussis de células completas en vacunas DPT.

## **Materiales y Métodos**

### **Muestras**

Se utilizaron muestras de la vacuna DPT<sup>®</sup> (toxoides tetánico y diftérico combinados con pertussis de células completas y adyuvados en gel de hidróxido de aluminio), provenientes del Instituto Finlay y Glaxo Smith-Kline, GSK. Todos los lotes de vacunas fueron liberados tanto por los respectivos fabricantes como por el CECMED.

### **Patrones y reactivos**

Como patrones de toxina pertussis y lipooligosacárido se utilizaron el primer patrón internacional de toxina pertussis JN1H-5 (10 µg y una actividad asignada de 10 000 UI por ampulla) y el patrón de LPS de *Bordetella pertussis* 89/670 (25 µg) respectivamente, ambos suministrados por el

National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

Los reactivos químicos que se utilizaron en los ensayos son de calidad, puros para análisis y fueron adquiridos de un proveedor certificado (Merck, Alemania).

### **Animales**

Para la realización de los ensayos de toxicidad específica se utilizaron ratones OF1 machos, con un peso entre 14 y 16 g. Todos los animales fueron adquiridos a través del Centro Nacional para la Producción de Animales de Experimentación (CENPALAB, Cuba), con categoría convencional, y recibidos con sus correspondientes certificados de la calidad higiénico-sanitaria y genética.

Durante el estudio los animales se mantuvieron en condiciones ambientales convencionales bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 h. La temperatura y humedad de los locales se monitoreó de forma sistemática, permaneciendo dentro de los límites especificados ( $21 \pm 2$  °C y  $60 \pm 10\%$ , respectivamente).

El pienso concentrado para el alimento de los ratones fue igualmente suministrado por el CENPALAB, acompañado de su certificado de calidad bromatológica e higiénico-sanitaria, y el agua fue preparada en el vivario, acidulada con ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de 2,5. El modelo de las cajas utilizadas para el estudio fue el T3 (adquiridas a través de Polylabo, Francia), sin encamado.

Los diseños experimentales y protocolos de ensayo, incluyendo los métodos de eutanasia, se sometieron a la consideración, análisis y aprobación de la Comisión de Ética de la institución, respetando en todo momento lo establecido por las regulaciones de seguridad biológica.

### **Ensayo de toxicidad específica para el componente pertussis de células completas (ganancia en peso)**

Se utilizaron 10 ratones por cada grupo de trabajo, incluyendo el grupo control. A los ratones se les mantuvo el suministro de agua y comida, siempre previendo el agotamiento de estos componentes durante todo el tiempo que duró el estudio. El peso total de cada grupo de ratones fue medido inmediatamente antes de la inoculación de la muestra. Cada ratón recibió una inyección intraperitoneal de 0,5 mL de una solución acuosa de cloruro de sodio al 0,85% que contenía la mitad de la dosis recomendada a humanos; entretanto los animales del grupo control fueron inoculados con solución salina (cloruro de sodio al 0,85%). El peso total de cada grupo fue medido a los 3 y 7 días posteriores a la inoculación. El producto es considerado no tóxico si al tercer día de la inmunización el peso total de los ratones no es inferior al peso total inicial, si al séptimo día del tratamiento la ganancia en peso promedio de los ratones es al menos el 60% del grupo control y si no más del 5% del total de ratones muere (1, 9).

## Estudios de sensibilidad

Para determinar el nivel de sensibilidad del ensayo de ganancia en peso en presencia de elementos tóxicos se prepararon muestras que contenían 1, 5, 10, 20, 30 y 50 µg/mL del patrón de LPS en solución salina, y muestras que contenían 0,1; 0,3, 0,5; 0,75 y 1 µg/mL del estándar internacional de toxina en solución salina.

Igualmente se prepararon tres combinaciones diferentes de ambos elementos (LPS 30 µg/mL + TxP 0,5 µg/mL, LPS 30 µg/mL + TxP 0,25 µg/mL y LPS 20 µg/mL + TxP 0,5 µg/mL). En todos los casos se evaluaron de forma paralela una vacuna DPT que hubiese pasado satisfactoriamente el ensayo de toxicidad específica por ganancia en peso en ratones y un grupo control. Los ensayos de ganancia en peso fueron realizados e interpretados como mismo se describió.

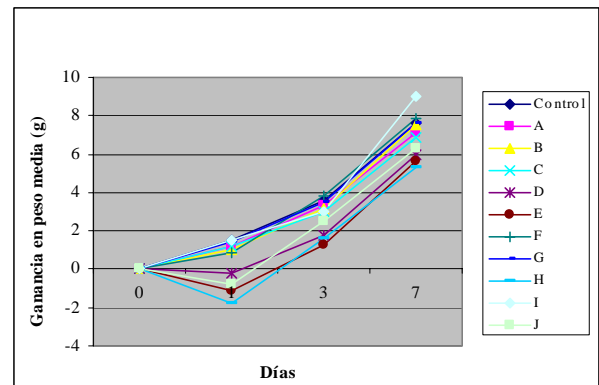
## Estudio de precisión interensayo

Se evaluaron tres lotes de vacuna DPT en tres ensayos de toxicidad específica independientes, realizados por distintas analistas y en días diferentes. Se determinó el porcentaje de ganancia en peso para cada lote en cada ensayo y la variabilidad se estimó a partir del cálculo del coeficiente de variación (CV: desviación estándar / media x 100), el cual puede estar comprendido entre el 50% y el 150% para este tipo de método (18).

## Resultados y Discusión

La disponibilidad de laboratorios con personal experimentado y capacitado constituye una de las fortalezas que debe tener una autoridad reguladora de medicamentos para que sea considerada competente y funcional, según establece la Organización Mundial de la Salud (19). Una de las funciones a las cuales los laboratorios deben brindar servicios es a la liberación de lotes de vacunas.

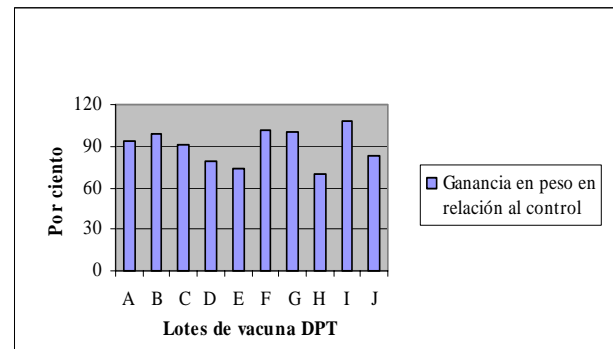
El Laboratorio Nacional de Biológicos del CECMED participa en este proceso a través de la evaluación de los lotes por ensayos de actividad biológica (potencia) o de seguridad (pirógenos, inocuidad o toxicidad), en función de la relevancia de estos ensayos para el aseguramiento de la calidad, seguridad y eficacia de estos productos biológicos. En el caso de las vacunas que contienen células completas inactivadas de *Bordetella pertussis* resulta de suma importancia que el laboratorio posea métodos que permitan monitorear la seguridad de las mismas, tomando en consideración la reactogenicidad atribuida al componente pertussis. Para ello el Laboratorio de Biológicos disponía del ensayo de toxicidad específica por ganancia en peso en ratones, sin embargo, reportes sobre las limitaciones de este ensayo nos llevaron a evaluar su relevancia para utilizarlo como parte de la batería de ensayos de liberación de lotes de vacunas DPT.



**Figura 1.** Comportamiento del ensayo de toxicidad específica (ganancia en peso) realizado a 10 lotes de vacuna DPT.

La Figura 1 muestra los resultados derivados de la evaluación por el ensayo de ganancia en peso en ratones de 10 lotes de vacuna DPT provenientes de dos fabricantes diferentes. Como puede apreciarse, existe un incremento sistemático del peso promedio de los grupos de animales inmunizados con vacuna equivalente al observado para el grupo control. Es cierto que al primer día de inoculación la ganancia media de algunos grupos inoculados con la vacuna disminuye, sin embargo, este es un efecto transiente que desaparece a partir del segundo día en todos los casos.

Esta pérdida de peso de los ratones en el primer día posterior a la inmunización, acompañado frecuentemente de otros signos clínicos de enfermedad aparente, ha sido reportada como un efecto pertussis-específico, cuyo mecanismo se desconoce, pero no se asocia a toxicidad como tal (20). Pese a este efecto todos los grupos inoculados con la vacuna cumplieron con la especificación definida para el ensayo, según se muestra en la Figura 2: los 10 grupos inmunizados tuvieron una ganancia en peso superior al 60% en relación con el grupo control una vez transcurridos los 7 días correspondientes a cada ensayo. De igual forma, se cumplieron los criterios relativos al incremento del peso transcurridos tres días de la inoculación y la sobrevivencia de todos los animales involucrados en los ensayos.



**Figura 2.** Porcentaje de ganancia en peso de 10 lotes de vacuna DPT en relación al control.

Aunque es cierto que todos los lotes cumplieron el criterio de aceptación definido para este ensayo de toxicidad específica, es posible que la reducción que se observó para algunos lotes sobre el peso promedio de los ratones al primer día de inoculación con la vacuna se debiese a la presencia de elementos tóxicos como el LPS y la TxP en pequeñas concentraciones.

Se cree que estos elementos por separado o combinados pueden ser los responsables de la pérdida de peso en ratones, si bien está claro que este criterio de toxicidad es altamente inespecífico (21). Sin embargo, la potencial presencia de estos componentes no produjo incumplimiento de la especificación del ensayo, lo cual provocó dudas sobre la capacidad del método para discriminar entre los productos reactogénicos y no reactogénicos. Es por ello que se procedió a evaluar la capacidad del método para detectar determinados niveles de dichos componentes tóxicos.

La Tabla 1 ilustra que no existió incumplimiento de la especificación del ensayo de ganancia en peso para las muestras que contenían entre 1 y 30 µg/mL de LPS, si bien es cierto que la muestra que tenía 30 µg/mL obtuvo un valor de 61% de ganancia en peso en relación con el control, o sea, apenas un 1% superior a la especificación. Otro resultado interesante es que para concentraciones superiores a los 5 µg LPS/mL se produjo una disminución del peso promedio de los ratones con relación al grupo control antes del tercer día posterior a la inoculación.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios realizados por otros autores, en los cuales 15 µg LPS/dosis causaron una pérdida de peso de corto término (en los dos primeros días posteriores a la inmunización), pero cumpliendo sin dificultades la especificación del ensayo (6), entretanto 5 µg LPS/dosis no pudo ser detectado por el ensayo de ganancia en peso (7).

**Tabla 1. Sensibilidad del ensayo de ganancia en peso para detectar diferentes niveles de endotoxina.**

Muestra	Ganancia en peso promedio al primer día (g)	Ganancia en peso promedio al séptimo día (g)	Ganancia en relación con el control al séptimo día (%)
Control	1,8	8,2	-
Lote de vacuna DPT	1,4	7,9	96
LPS 1 µg/mL	0,8	6,3	77
LPS 5 µg/mL	0,2	5,9	72
LPS 10 µg/mL	-0,5	5,3	65
LPS 20 µg/mL	-1,3	5,3	65
LPS 30 µg/mL	-1,6	5,0	61
LPS 50 µg/mL*	-2,5	3,8	46

(\*) Esta concentración de LPS provocó adicionalmente la muerte de animales durante el ensayo.

**Tabla 2. Sensibilidad del ensayo de ganancia en peso para detectar diferentes niveles de toxina pertussis.**

Muestra	Ganancia en peso promedio al séptimo día (g)	Ganancia en relación con el control al séptimo día (%)
Control	7,9	-
Lote de vacuna DPT	7,2	91
TxP 0,1 µg/mL	6,5	82
TxP 0,3 µg/mL	5,9	75
TxP 0,5 µg/mL	5,2	66
TxP 0,75 µg/mL (*)	3,8	48
TxP 1 µg/mL (*)	3,8	40

(\*) Estas concentraciones de TxP provocaron adicionalmente la muerte de animales durante el ensayo.

Cabe destacar que aún cuando las ganancias en peso de las muestras con LPS que cumplieron con la especificación fueron notablemente inferiores al valor obtenido por el lote de vacuna utilizado como control del producto (96%), estos no se diferenciaron mucho de la mayor parte de los valores obtenidos para los lotes de vacuna DPT evaluados previamente.

En cuanto a la muestra que contenía 50 µg/mL de LPS, esta fue la única que no cumplió con la especificación del ensayo, pues además de tener un porcentaje de ganancia en peso inferior al 60% (46%) una vez transcurridos los 7 días de ensayo, ello coincidió con el hecho de ser la única concentración de LPS en la cual murieron animales durante el ensayo.

Por su parte, la Tabla 2 muestra qué concentraciones de TxP entre 0,1 y 0,5 µg/mL no provocaron un fallo en la especificación del ensayo de ganancia en peso, y sólo valores superiores a los 0,75 µg/mL fueron capaces de producir un porcentaje de ganancia en peso inferior al 60% relativo al control, lo cual igualmente coincidió con un incremento de la mortalidad de los animales.

Otros autores han encontrado que una concentración de 0,4 µg TxP/dosis causó una significativa pérdida de peso en comparación con el grupo control, en tanto una concentración de 0,75 µg TxP/dosis mostró un incremento de la mortalidad de los ratones (7).

La Tabla 3 muestra los efectos al combinarse concentraciones diversas de TxP y LPS. Para ello se utilizaron concentraciones por debajo de aquellas que habían producido toxicidad al evaluar los componentes por separado. De las combinaciones realizadas, solamente la que contenía 30 µg/mL de LPS + 0,5 µg/mL de TxP produjo un incumplimiento de la especificación del ensayo (40% de ganancia en peso relativa al control). En concordancia con lo anterior, existen reportes que demuestran que 15 µg LPS combinados con 0,45 µg TxP en una dosis de 0,5 mL provocan un fallo de la especificación del ensayo de ganancia en peso (6).

**Tabla 3. Sensibilidad del ensayo de ganancia en peso para detectar diferentes combinaciones de toxina pertussis y endotoxinas**

Muestra	Ganancia en peso promedio al séptimo día (g)	Ganancia en relación con el control al séptimo día (%)
Control	7,3	-
Lote de vacuna DPT	7,1	97
LPS 30 µg/mL + TxP 0,5 µg/mL (*)	2,9	40
LPS 30 µg/mL + TxP 0,25 µg/mL	5,1	70
LPS 20 µg/mL + TxP 0,5 µg/mL	4,8	66

(\*) Esta combinación de LPS y TxP provocó adicionalmente la muerte de animales durante el ensayo.

Los resultados presentados en las tablas anteriores demuestran que sólo concentraciones equivalentes a 50 µg/mL de LPS, 0,75 µg/mL de TxP o la combinación de 30 µg/mL y 0,5 µg/mL de TxP son capaces de provocar un incumplimiento de la especificación del ensayo de ganancia en peso para el componente pertussis. Sin embargo, las concentraciones de estos elementos tóxicos en todas las vacunas DPT que se producen actualmente en el mundo están ampliamente por debajo de estos valores. Por ejemplo, se conoce que los valores de TxP están bien por debajo de los 0,5 µg/mL, entretanto los valores de endotoxinas están entre los 0,9 y 2,8 µg/mL, lo cual confirma la incapacidad de este ensayo para detectar estos componentes a los niveles en que se encuentran en las vacunas DPT que se comercializan hoy en día (22).

Otro de los elementos que cuestionan el empleo del ensayo de ganancia en peso para la evaluación de la toxicidad

específica del componente pertussis en vacunas es su variabilidad. La Tabla 4 muestra la dispersión de los porcentajes de ganancia en peso para 3 lotes analizados en 3 ensayos independientes.

La variabilidad obtenida puede considerarse como aceptable entre el 20 y el 26%, considerando las características del ensayo y si se compara con el 30% de variabilidad reportado en un estudio de reproducibilidad interlaboratorio desarrollado en 1994, aún cuando debe considerarse que este último estudio involucró 14 laboratorios y diversas cepas de ratón, lo cual influyó directamente en la variabilidad obtenida (23).

Resulta llamativa esta alta variabilidad a pesar del uso de animales controles, evidencia del alto grado de estandarización que requiere el ensayo, lo cual no lo hace práctico para monitorear la seguridad de este tipo de vacunas por parte del Laboratorio Nacional de Biológicos.

**Tabla 4. Variabilidad intralaboratorio del ensayo de ganancia en peso.**

Lote de vacuna DPT	Ganancia en peso del	Ganancia en peso del	Ganancia en peso del	CV (%)
	Ensayo 1 (%)	Ensayo 2 (%)	Ensayo 3 (%)	
A	102	64	70	26
B	92	70	63	20,2
C	110	72	79	23,2

El CV se calculó según la siguiente fórmula: (Desviación estándar / Media) x 100.

De esta forma nuestro trabajo demostró que, al igual que se reporta en estudios recientes (24), el ensayo de ganancia en

peso es una prueba no específica, muy poco sensible y con la variabilidad inherente a este tipo de ensayos, lo que

constituye grandes limitaciones para su utilización como ensayo rutinario para la liberación de lotes de vacuna DPT por parte de la autoridad reguladora de medicamentos. Fue un hecho muy poco objetivo como criterio de toxicidad específica para pertussis, no sólo por la incapacidad del ensayo para detectar concentraciones altas de componentes tóxicos que usualmente se encuentran a bajas concentraciones en las vacunas DPT, sino también porque este parámetro y el concepto de salud animal no están del todo relacionados. Es bien conocido que la ganancia en peso puede producirse como resultado de procesos fisiopatológicos como la peritonitis, la formación de ascitis y el incremento patológico de órganos como el bazo o el páncreas (25), lo cual puede provocar dificultades con la interpretación de los resultados del ensayo. Resultados como estos impulsan a la reflexión sobre hasta dónde la reactividad de vacunas que contienen células inactivadas de *Bordetella pertussis* puede ser atribuida solamente al contenido de LPS y TxP, sino más bien a un grupo de complejas interacciones entre los antígenos de pertussis, el adyuvante y otros componentes de las vacunas.

Es cierto que el ensayo de ganancia en peso es la prueba oficial que aparece incluso en la actualización de los requisitos de la Serie de Informes Técnicos de la OMS para vacunas que contienen células inactivadas de *Bordetella pertussis* (26), y este en teoría fue diseñado e implementado para prevenir la aparición de reacciones adversas en niños inmunizados con vacunas. Aunque durante años se ha reportado que existe correlación entre esta prueba y la aparición de eventos adversos en niños, con millones de dosis liberadas sobre la base de los datos de seguridad aportados por este ensayo, numerosos autores plantean que tal relación es poco convincente o más bien fortuita, no existiendo relación entre el número de inmunizaciones y la frecuencia de aparición y magnitud de las reacciones adversas en niños y los resultados de la ganancia en peso (14-17, 27). Lo anterior, sumado a las limitaciones técnicas de esta prueba, indica la necesidad de ensayos más sensibles y reproducibles que puedan sustituir o complementar la prueba de ganancia en peso, en particular los métodos alternativos basados en el principio de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) (28).

## Referencias

1. WHO. Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines. WHO Technical Report Series, No, 800 1990, Annex 2.
2. Corbel MJ, Xing DKL. The current status of acellular pertussis vaccines. *Journal of Medical Microbiology* 1997;46:817-818.
3. Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, et al. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 1982; 21(22):5516-5522.
4. Munoz J. Biological activities of pertussigen (pertussis toxin) In: Sekura R, Moss J, Vaughan M, Eds. *Pertussis toxin*. London, UK: Academic Press; 1985:1-18.
5. Xing D, Canthaboo C, Corbel MJ. Effect of pertussis toxin on induction of nitric oxide in murine macrophages and protection in vivo. *Vaccine* 2000;18:2110-2119.
6. Gupta RK, Saxena SN, Sharma SB. The effects of purified pertussis components and lipopolysaccharide in the results of the mouse weight gain test. *Journal of Biological Standardisation* 1986;16:321-331.
7. Redhead K, Seagroatt V. The effects of purified components of *Bordetella pertussis* in the weight gain test for the toxicity testing of pertussis vaccines. *Journal of Biological Standardisation* 1986;14:57-65.
8. Bacterial endotoxins. In: *European Pharmacopoeia 4th Edition*, European Pharmacopoeia Commission, France 2002:140-147.
9. Diphtheria, tetanus and pertussis vaccine (adsorbed). In: *European Pharmacopoeia 4th Edition* 2002:2178-2200.
10. Pertussis vaccine (acellular, component, adsorbed). In: *European Pharmacopoeia Supplement* 2000: 1050-1052.
11. Pertussis vaccine. In: *US Code of Federal Regulations*, Government Printing Office, DC, USA 1983:58-61.
12. Pittman M. Influence of preservatives, of heat, and of irradiation on mouse protective activity and detoxification of pertussis vaccines. *Journal of Immunology* 1952;69:201-216.
13. Cohen H, van Ramshorst JD, Drion EF. Relation between toxicity tests in mice and reactions in children using four lots of quadruple vaccine (DPT-polio). *Sym, Series Immunobiol, Standardisation* 1969;10:53-62.
14. Milton ML, Burland WL. Pertussis-containing vaccines: The relationship between laboratory toxicity tests and reactions in children, *Sym, Series Immunobiol, Standardisation* 1970; 13: 150-156.
15. Perkins FT, Sheffield F, Millar CL, Skegg JL. The comparison of toxicity of pertussis vaccines in children and mice, *Sym, Series Immunobiol, Standardisation* 1970;13:41-49.
16. Hooker JM. A laboratory study of the toxicity of some diphtheria-tetanus-pertussis vaccines, *Journal of Biological Standardisation* 1981; 9: 493-506.
17. Nyerges G, Adam MM, Gacs P and Ring R, A comparison of combined diphtheria, tetanus and pertussis vaccines produced by different manufacturers, in laboratory animals and in infants. *Journal of Biological Standardisation* 1986; 14:241-247.
18. WHO, *Supplementary Guidelines on GMP: Validation*, 2003.
19. WHO, *Regulation of Vaccines: Building on existing Drug Regulatory Authorities*, WHO, Geneva 1999: 9-11.
20. Pittman M and Cox CB. Pertussis vaccine testing for freedom-from-toxicity, *Applied Microbiology* 1965;13: 447-456.
21. Van Straaten-Van de Kappelle I, Wieria EJHJ, Marsman FR, Borsboom DJM, Van de Donk HJM and Kreeftenberg JG. The modified leukocytosis promoting factor (LPP)-test. A valuable supplement to the mouse weight gain (MGW test) test in

- toxicity control of whole cell pertussis vaccine, *Biologicals* 1992; 20:277-282.
22. Ibsen P, Moller S and Heron I. Lipopolysaccharides in a traditional pertussis vaccine, *Journal of Biological Standardisation* 1988;16: 299.
  23. Van Straaten-Van de Kappelle I, Van der Gun JW, Marsman FR, Hemdriksen CFM and Van de Donk HJM. Collaborative study on test systems to assess toxicity of whole cell pertussis vaccine. *Biologicals* 1997; 25: 41-57.
  24. Xing DKL, Canthaboo C, Corbel MJ. Laboratory testing of whole-cell pertussis vaccines: a WHO proficiency study using the Kendrick test. *Vaccine* 2002; 20:342-351.
  25. Goto N, Ueno G and Iwasa S. Swelling reaction of the pancreas in guinea-pigs caused by aluminium-adsorbed diphtheria-purified pertussis-tetanus combined vaccine. *Microbiological Immunology* 1987;31:89-93.
  26. WHO. Recommendations for whole-cell pertussis vaccines. WHO Technical Report Series No, 941 2007, Annex 6.
  27. Baraff LJ, Manclark CR, Cherry JD, Christenson P and Marcy SM. Analysis of adverse reactions to diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine by vaccine lot, endotoxin content, pertussis vaccine potency and percentage of mouse weight gain. *Pediatrics Infectious Disease Journal* 1989;6:502-507.
  28. Corbel M, Xing DKL. Toxicity and potency evaluation of pertussis vaccines. *Expert Reviews Vaccines* 2004;3(1):89-101.

## **Limitations of specific toxicity assay for whole-cell pertussis component**

### **Abstract**

Vaccines containing whole-cell Pertussis component have been used with a high effectiveness in National Immunisation Programs worldwide. Despite of their efficacy, concerns remained in regard to reactogenicity due to the presence of components like Pertussis toxin and endotoxins. During decades the specific toxicity of Pertussis component has been monitored by the Mouse Weight Gain Test, but the test has been criticised in terms of lack of specificity and sensitivity and great variability. That is why the National Control Laboratory decided to evaluate its relevance for the release of DPT vaccine lots. We evaluated different concentrations of endotoxins and pertussis toxin as well as the variability among assays. The results showed that only very high concentrations of endotoxin and pertussis toxin were able to produce a reduction of the weight gain in mice and a specification failure of the assay. This aspect and the great variability found were determinant to decide not to use this test for the release of DPT vaccine lots and to remain looking for new alternatives.

**Keywords:** Whole-cell Pertussis, Mouse Weight Gain Test, Limitations of the method.

*Recibido: Agosto 2008*

*Aprobado: Octubre 2008*