

# Métodos alternativos como parte de las nuevas tendencias en el control de calidad de vacunas

Mario Landys-Chovel\*

Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

**email:** mlandys@finlay.edu.cu

---

El control de calidad de las vacunas resulta fundamental para las actividades de producción, liberación lote a lote y comercialización de las vacunas. Sin embargo, en la actualidad este es un proceso que por su concepción es lento y costoso debido a que se apoya en la realización de extensas pruebas en animales para demostrar la potencia y seguridad de estos productos biológicos. El desarrollo de métodos alternativos inspirados en el principio de las 3Rs (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) constituye una tendencia que debe impactar de manera muy significativa en la reducción de los tiempos de liberación y el costo del proceso de control de calidad de vacunas en los próximos años. En particular la sustitución de las pruebas de potencia y toxicidad in vivo por procedimientos alternativos más relevantes, rápidos, exactos, reproducibles, robustos y baratos, que incluyen la serología, la cuantificación directa de antígeno, los ensayos en cultivos celulares y el enfoque a consistencia, por solo mencionar algunos; implica un cambio de paradigma, con indiscutibles repercusiones éticas, logísticas, económicas y científico-técnicas, para el aseguramiento de los parámetros de calidad de los inmunobiológicos con el mejor balance costo-beneficio: las vacunas. Los fundamentos técnicos de estos métodos alternativos, sus ventajas y nivel de implementación a nivel internacional, así como sus principales limitaciones, son abordados en este trabajo.

**Palabras clave:** Métodos alternativos, control de calidad, pruebas de potencia, toxicidad, vacunas.

---

## Introducción

Las vacunas son consideradas las más efectivas herramientas para la prevención de enfermedades infecciosas. De hecho, el uso de las vacunas y demás inmunobiológicos, junto a mejoras en aspectos de higiene, dieta y alojamiento, tuvo un impacto fundamental en la reducción de la mortalidad y la morbilidad de un buen número de enfermedades infecciosas a partir del siglo XIX. En los años venideros la importancia de estos productos biológicos continuará incrementándose, tomando en cuenta, entre otros factores, la necesidad de la erradicación de enfermedades a nivel global, la emergencia de cepas de bacterias resistentes a antibióticos y la reemergencia de algunas infecciones virales y bacterianas que se consideraban virtualmente eliminadas (1).

Hasta el momento, y a pesar de los nuevos avances en vacunología, la producción de la mayoría de las vacunas comercializadas aún se basa en técnicas convencionales, que incluyen la atenuación, inactivación o destoxificación de la cepa de microorganismo o toxina para adecuarla a los propósitos de la inmunización. Debido a la complejidad de los procesos de producción de vacunas y a la existencia de múltiples variables que pueden afectar

la calidad del producto resultante, es esencial desarrollar un número significativo de pruebas de control de calidad para garantizar la seguridad y eficacia lote a lote, de modo que se demuestre la inocuidad del producto y su capacidad para inducir protección tras la inmunización (2).

No obstante, en los últimos años existe un cambio de paradigma en la estrategia para acometer el control de calidad de las vacunas debido a los siguientes factores:

- La evolución del concepto de control de calidad, dirigido más bien a asegurar la consistencia de un producto que ya ha demostrado ser seguro y eficaz.
- El desarrollo de una nueva generación de vacunas y productos biológicos bien definidos y caracterizados desde el punto de vista molecular, lo cual reduciría la necesidad del extenso y costoso control por ensayo que se realiza hoy en día.
- La prioridad que se le está otorgando al desarrollo e implementación de métodos alternativos a los ensayos clásicos en animales (3).

En particular el desarrollo e implementación de los métodos alternativos se basa en el principio de las 3Rs (Refinamiento, Reducción y Reemplazo) y

---

\* Máster en Farmacología Experimental, Director de Control de Calidad IFV.

surge como respuesta a un reclamo de la comunidad internacional, en particular en países desarrollados, que se oponía al empleo indiscriminado de animales en la experimentación biomédica (4). Las principales razones para la oposición son de naturaleza ética, debido al severo dolor y sufrimiento a que son sometidos los animales en muchos ensayos (5), pero también deben considerarse las razones económicas atribuibles al costo por el número de animales utilizados en los ensayos y su mantenimiento especializado, así como científico-técnicas si se toman en cuenta la irrelevancia de algunos ensayos y su elevada variabilidad (6). Estas limitaciones han impulsado el desarrollo de los métodos alternativos, los cuales se nutren cada vez más del desarrollo científico y tecnológico alcanzado por la humanidad en los últimos años.

El objetivo del presente trabajo de revisión es ofrecer una panorámica actualizada acerca de los principales métodos alternativos en uso o en progreso, como parte de las nuevas tendencias para el control de calidad de vacunas.

## 1. Ensayos de actividad biológica

### Ensayos serológicos

Los ensayos de actividad biológica o potencia, consistentes en la medición de uno o más parámetros relacionados directa o indirectamente con la eficacia, han sido considerados hasta hoy el pilar fundamental del control de calidad de las vacunas. Su diseño difiere en función del tipo de vacunas. En el caso de las vacunas vivas atenuadas (Bacilo de Calmette-Guerin o BCG, Polio oral trivalente, Triple viral Papera-Rubeola-Sarampión, Fiebre amarilla) la eficacia de cada lote de vacuna está relacionada con el número de partículas vivas, las cuales son satisfactoriamente determinadas por conteo o por titulación *in vitro* (6).

Bien diferente resulta el escenario en el caso de las vacunas inactivadas, para las cuales los ensayos de potencia son desarrollados en especies animales sensibles, por lo general en modelos de reto, es decir, inmunización de los animales y posteriormente reto con la cepa virulenta para demostrar protección inmunitaria como medida de la eficacia clínica. Es por ello que estos ensayos han sido considerados como reglas de oro (“golden standard”) a la hora de estimar la calidad y eficacia de las formulaciones vacunales. Sin embargo, se ha demostrado que, salvo excepciones, la mayor parte de estos ensayos no constituyen verdaderos correlatos de protección clínica. Incluso en aquellas vacunas donde tradicionalmente se

ha considerado el ensayo de reto como una medida de la eficacia en niños (como es el caso de los ensayos de reto para los componentes tetánico y pertussis), hoy se estima que la correlación entre ambos parámetros es cuando menos cuestionable (6, 7).

Si tomamos en consideración lo anteriormente descrito y sumamos las indiscutibles desventajas de los ensayos de reto en términos técnicos (complejidad, riesgos biológicos, larga duración, gran variabilidad) y económicos, así como los cuestionamientos éticos, puede comprenderse el actual esfuerzo por desarrollar e implementar técnicas analíticas más adecuadas, rápidas, éticas y relevantes en el propósito de asegurar la consistencia lote a lote de las producciones de vacunas.

Una de las principales tendencias se basa en la sustitución de las pruebas de reto por ensayos serológicos, apoyados en la relevancia de los anticuerpos para la inmunidad inducida por vacunas y las ventajas de las metodologías *in vitro* disponibles en la actualidad para cuantificar anticuerpos. Los ensayos serológicos excluyen el uso de microorganismos virulentos o toxinas, por lo que resultan pruebas de mayor seguridad; eliminan de forma automática el reto y por tanto disminuyen significativamente los niveles de estrés y dolor en los animales de ensayo; el número de animales empleado disminuye a partir de su menor variabilidad intrínseca (intervalos de confianza menores) y por la sustitución de los animales utilizados en la fase de reto por procedimientos *in vitro* de cuantificación de anticuerpos (ELISA, titulación en cultivos celulares, hemaglutinación), más rápidos, exactos, precisos y robustos; el tiempo de ejecución de los ensayos se acorta a partir de la disponibilidad de un punto final de ensayo cuantitativo y más temprano respecto a la aparición de signos clínicos indicativos de la enfermedad o la muerte (6).

Dentro de los ensayos serológicos internacionalmente aceptados como alternativas a los tradicionales ensayos de reto están los desarrollados para los componentes tetánico, diftérico, pertussis, antirrábico y antileptospirosico. Estos ensayos pueden ser multi-dilución, simulando el mismo diseño de la etapa de antigenicidad de los ensayos de reto, pero la actual tendencia es la introducción paulatina de ensayos serológicos de dilución única, tanto para la vacuna de referencia como para los lotes de vacunas objeto de evaluación. En cuanto a los métodos *in vitro* para la cuantificación de anticuerpos, los ELISA son las técnicas de elección, tanto los que emplean como sustancias de recubrimiento las subunidades de vacunas (tétano, difteria, pertussis acelular, rabia), como los

que utilizan células enteras (pertussis, leptospira). No obstante, otros procedimientos como la titulación en cultivos celulares (por ejemplo, células VERO para el componente diftérico) son igualmente empleados (8-10).

La serología tiene como ventajas adicionales, por una parte, la posibilidad de almacenar el material de ensayo (sueros) por un período prolongado, a fin de dar respuesta a situaciones derivadas de la vigilancia postcomercialización o ante demandas reguladoras, y por otra la eficiencia que puede lograrse a partir de la combinación de la prueba para varios antígenos (formulación de vacuna combinada), lo cual igualmente impacta en el número global de animales empleados en las pruebas (11). Recientemente se han propuesto sistemas como el Multiplex que permite la cuantificación simultánea de los títulos de anticuerpos generados por la inmunización de varios antígenos vacunales (12).

Los ensayos serológicos también han sido evaluados como métodos alternativos a las pruebas de seroneutralización in vivo, desarrolladas por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) y adoptadas por la Agencia de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA), en tanto han sido ampliamente implementadas por los países de Latinoamérica para controlar la potencia de vacunas de toxoides tetánico y diftérico. Si bien el diseño y el enfoque de estas pruebas difiere notablemente de las pruebas de reto aprobadas por la Organización Mundial de la Salud y la Farmacopea Europea, la tendencia ha sido igualmente la adopción de metodologías in vitro (ELISA, titulación en células VERO) en lugar de la etapa final de los ensayos de seroneutralización in vivo, en las cuales se mezclan diluciones de sueros (conteniendo anticuerpos derivados de la inmunización con vacuna) con toxina para retar a los animales con vistas a demostrar protección (13-15).

Aunque la serología constituye una reconocida, generalizada y válida alternativa a las pruebas de reto, deben considerarse igualmente algunas desventajas. Por ejemplo, si bien el ELISA posee numerosas ventajas técnicas como: su relativa facilidad de ejecución, la disponibilidad de reactivos comerciales, su elevada especificidad, su adecuado desempeño en términos de exactitud, precisión y robustez, en este tipo de ensayo se suele sobreestimar la concentración de anticuerpos en el suero. Ello se debe a que en su calidad de ensayo de unión, los anticuerpos de baja afinidad, producidos durante los primeros días de inmunización, se unen a la fase sólida del ensayo y por tanto son cuantificados, en tanto las pruebas de reto solamente miden los

anticuerpos funcionales o neutralizantes. Esta limitante no posee mayor relevancia, siempre y cuando exista una adecuada correlación entre el ensayo serológico (ELISA) y la prueba de reto y ambos métodos sean capaces de discriminar de forma equivalente entre lotes de diferente actividad biológica, incluyendo muestras subpotentes (6, 16). Otros cuestionamientos relativos al empleo de sueros hiperinmunes como: curvas de calibración obtenidos por esquemas de inmunización diferentes a los sueros objeto de ensayo, con la consiguiente diferencia en la avidéz y afinidad de anticuerpos e impacto potencial en el paralelismo de las respuestas, el empleo de un número aún significativo de animales en el caso de algunos ensayos serológicos (en particular las pruebas multi-dilución) y la no relevancia biológica de la cuantificación de anticuerpos en relación con la protección han sido reportados (13, 17). No obstante, el valor de los ensayos serológicos como naturales sustitutos de las pruebas de reto en animales, bien sea solos o complementados por otros ensayos, es incuestionable.

### **Ensayos de cuantificación de antígeno**

Para algunas vacunas inactivadas la tendencia ha sido la introducción de ensayos de cuantificación de antígeno en lugar de las pruebas de actividad biológica en animales. Estos métodos son inmunoensayos in vitro que se basan generalmente en la unión de antígenos protectores claves, presentes en las muestras de vacunas, a sus anticuerpos específicos. Uno de los métodos representativos de esta tendencia lo constituyó el ensayo de potencia in vitro para el antígeno de superficie de la vacuna anti-hepatitis B recombinante, que sustituyó la prueba de inmunogenicidad en ratones. En su momento coexistieron dos tipos de inmunoensayos, el de cuantificación directa de antígeno, tipificado por el uso de los estuches comerciales de las compañías Abbott y Murex, y uno basado en la neutralización previa del antígeno con inmunoglobulina anti-hepatitis B y la posterior cuantificación de los anticuerpos remanentes como una medida indirecta de la concentración de antígeno (18-19).

Un enfoque similar fue implementado para la vacuna antirrábica, como una alternativa al ensayo de reto conocido por ensayo NIH. En este caso se trató de un ELISA desarrollado con anticuerpos monoclonales dirigidos a glicoproteínas y nucleoproteínas del virus de la rabia presentes en la vacuna (20). Si bien este ha sido un ensayo que logró incluirse en la Farmacopea Europea para liberación de lotes de esta vacuna, todavía en la práctica se continúa haciendo la prueba NIH. Lo anterior se debe a que en la mayor parte de los estudios

de validación ha existido una pobre correlación entre ambos ensayos, lo cual parece deberse más a la elevada variabilidad de la prueba NIH que a problemas de desempeño del inmunoensayo (21). Este mismo tipo de ensayo (ELISA con empleo de anticuerpos monoclonales) ha sido satisfactoriamente evaluado para vacunas antileptospirosis veterinarias (22).

Otro de los ejemplos de inmunoensayos utilizados como una medida de la actividad biológica de vacunas inactivadas es la prueba de inmunodifusión radial para las vacunas de influenza.

La principal limitante en relación con la adopción de este tipo de ensayos como una medida de la potencia es que la mayor parte de las vacunas inactivadas contienen un adyuvante, el cual tiene que ser eliminado previo a la cuantificación antigénica. Este proceso tiene que ser eficiente en términos de recobrado del antígeno y retención de su integridad, lo que no siempre resulta alcanzable (6). Otra de las limitantes lo constituye la no disponibilidad de anticuerpos monoclonales comerciales y el costo relativamente alto de su producción.

### **Ensayos inmunológicos in vitro en las fases de Investigación-Desarrollo y evaluación preclínica**

Si bien los ensayos de potencia utilizados en el control de calidad pueden ser reemplazados por métodos alternativos, hasta el momento no resulta aceptable hacer lo mismo en las fases de Investigación-Desarrollo y evaluación preclínica del ciclo de producción de las vacunas, en las cuales es obligatorio el empleo de ensayos funcionales in vivo bajo el esquema inmunización-reto (siempre que estos existan) para demostrar el papel de las estructuras antigénicas en la protección, así como las interacciones entre los componentes de las vacunas. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la contribución de modelos in vitro para el pesquisaje en estudios de desarrollo de vacunas, enfocados en aspectos particulares de la respuesta inmune como el rol de las células presentadoras de antígeno (CPA) en las respuestas de anticuerpos o la potencial relevancia de algunos antígenos para la inmunogenicidad (23).

Entre los modelos de inmunogenicidad disponibles se encuentran los que se basan en los cultivos simples de células mononucleares sanguíneas periféricas y los más complejos consistentes en sistemas de co-cultivos de varios tipos de células inmunes (CPA, linfocitos B y T, células "Natural Killer" y células B de memoria y T) y accesorias (fibroblastos y células endoteliales), además de citoquinas y otros factores necesarios para la

comunicación intercelular (20, 24). Recientemente, un complejo sistema in vitro (MIMIC™) fue introducido en el mercado por la compañía VaxDesign. Este sistema está compuesto por 3 módulos integrados: un modelo tisular periférico, un modelo tisular linfóide y un modelo de enfermedad, representando cada uno un elemento funcional del sistema inmune (25).

Si bien se ha reportado una buena correlación entre la calidad de la vacuna y los perfiles de citoquinas tras la estimulación de células mononucleares sanguíneas periféricas con toxoide tetánico, y a pesar de lo prometedor que resulta la tecnología MIMIC, los modelos de inmunogenicidad in vitro aún deben mostrar su relevancia en la investigación y evaluación de vacunas, siendo su aporte al control de calidad aún poco significativo.

## **2. Ensayos de seguridad**

La seguridad constituye uno de los requisitos fundamentales de las vacunas. De hecho, muchos la consideran el requerimiento fundamental a partir del hecho de que los beneficios de las vacunas sólo pueden apreciarse a mediano y largo plazo, en cambio la aparición de eventos adversos son percibidos de inmediato, lo cual tiene un impacto negativo directo y considerable para la aceptación de las vacunas por la población. Es por ello que la seguridad debe mantenerse a través de procesos de producción consistentes, ensayos de seguridad rigurosos y la vigilancia post-comercialización. Si bien los ensayos en animales han resultado determinantes en la demostración de la seguridad de las vacunas, nuevas alternativas han sido desarrolladas sobre la base del principio de la 3Rs y la irrelevancia técnica de algunas de estas pruebas.

### **Ensayo de Inocuidad o Seguridad general**

El ensayo de Inocuidad o Seguridad general es desarrollado para detectar contaminantes inesperados. Se basa en la inmunización de 5 ratones y dos curieles con al menos una dosis humana y la observación de los mismos para la detección de alguna señal de enfermedad. Sin embargo, este ensayo ha demostrado su escaso valor predictivo a partir del pequeño número de animales utilizado, lo cual hace improbable la detección de contaminación. Es por ello que la tendencia actual en la última década ha sido emplearlo en la etapa de control de los graneles de vacunas en lugar del producto terminado.

Por su parte, la Farmacopea Europea ha eliminado este ensayo de las monografías de vacunas que cuentan con un ensayo de toxicidad específica, manteniéndolo solamente para vacunas que no disponen de tal ensayo, como es el

caso de las vacunas contra el Cólera, la Fiebre Tifoidea, el *Haemophilus influenzae* tipo b y la Influenza, así como las de polisacáridos pneumocócicos y meningocócicos. Esta decisión se basa igualmente en un análisis de riesgo, pues si los fabricantes cumplen adecuadamente con los requisitos de las Buenas Prácticas de Producción y garantizan la consistencia de sus fabricaciones, el riesgo de contaminación tóxica es extremadamente bajo (26-27). Algunos fabricantes han propuesto modificaciones del ensayo de Seguridad General que incluyen la introducción de curvas de incremento de peso específicas de vacunas y datos histopatológicos (28), pero los cuerpos reguladores internacionales (incluyendo la OMS) ya reconocen la pobre sensibilidad e irrelevancia técnica del ensayo, unido a los progresos en el cumplimiento de BPF a nivel global y la existencia de otros métodos de control que brindan información más confiable sobre la inocuidad de los productos, sugiriendo entonces su eliminación como ensayo de control de calidad de vacunas (29).

### **Ensayos de toxicidad específica y Reversión a la toxicidad**

Los ensayos de toxicidad específica y reversión a la toxicidad se diseñan fundamentalmente para vacunas bacterianas inactivadas como un chequeo final del proceso de inactivación. Este es un ensayo que en función del tipo de vacuna se realiza en curieles o ratones, en función de la sensibilidad de la especie a la exotoxina en cuestión.

En la actualidad existen métodos alternativos de una gran sensibilidad para la detección de toxicidad residual en vacunas. Uno de los más implementados es el ensayo en células Vero, el cual es muy sensible para toxina diftérica y por lo tanto ideal para detectar cantidades mínimas de toxina residual en toxoides purificados. Es por ello que este ensayo es uno de los métodos alternativos validados internacionalmente reconocidos como un sustituto de la prueba de toxicidad específica en curieles, ya sea por el método subcutáneo o intradérmico. Otro de los ensayos en cultivos celulares que se ha empleado como método alternativo de manera satisfactoria es el ensayo en células CHO para sustituir la prueba de ganancia en peso para componente pertussis (30).

Si bien ambos ensayos en cultivos de células poseen mayor sensibilidad que las pruebas en animales, deben considerarse algunas limitantes como la interferencia del adyuvante y la toxicidad no específica provocada por algunos excipientes como el tiomersal y el formaldehído residual. Por otra parte, la logística asociada a los laboratorios de cultivos de células encarece las determinaciones, requiriéndose además de personal bien

entrenado en este tipo de actividad técnica. No obstante, su efectiva implementación contribuye a la reducción de animales durante los controles de ingredientes farmacéuticos activos y graneles de vacunas.

Otra de las nuevas tendencias son los ensayos de medición de la actividad enzimática de las toxinas mediante reacciones bioquímicas que involucran péptidos sintéticos fluorescentes, los cuales mimetizan los sustratos naturales que utilizan las toxinas. Los productos de degradación son cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorescente. Estos métodos han mostrado una elevada especificidad y sensibilidad para toxinas tetánica y pertussis, sin embargo aún deben desarrollarse estudios de validación que aseguren su capacidad para sustituir las pruebas de toxicidad clásicas (31). Otro método en progreso lo constituye el denominado BINACLE test (ensayo de unión y ruptura, por sus siglas en inglés), el cual es específico para detectar niveles residuales de la neurotoxina tetánica a partir de la combinación en un mismo modelo de la capacidad de unión de la holotoxina a su receptor (principalmente gangliósido GT1b) con su acción enzimática, que se produce al reducirse y activarse las cadenas L que a su vez ocasionan la ruptura de la sinaptobrevina. La cuantificación de los fragmentos de esta molécula es directamente proporcional a la inhibición del neurotransmisor en las motoneuronas (32).

### **Ensayos de neurovirulencia**

Los ensayos de neurovirulencia son desarrollados para verificar la no reversión a la virulencia de las vacunas vivas atenuadas, ensayos que son realizados en monos, y que han demandado el desarrollo de alternativas por razones éticas, pero también por el limitado poder discriminativo de estas pruebas.

El desarrollo de cepas de ratón transgénicas, capaces de expresar el receptor de poliovirus humano, ha permitido que sea posible reproducir en estos ratones los mismos signos clínicos y lesiones en el Sistema Nervioso Central que inducen los serotipos de poliovirus en los monos. Por otra parte, la detección y cuantificación de mutaciones en el genoma constituyen la base de un método in vitro para este propósito, que parte del principio de que la reversión a la virulencia es el resultado de mutaciones menores en el genoma. Este método se denomina: análisis de mutantes por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y fragmentación por enzimas de restricción (MAPREC, por sus siglas en inglés), el cual consta de las siguientes etapas: extracción del ARN de la vacuna, transcripción inversa y amplificación del ADNc por

PCR, fragmentación utilizando enzimas de restricción y separación de los fragmentos y cuantificación de las bandas en gel. El MAPREC ha mostrado una buena correlación con la neurovirulencia inducida en monos por poliovirus tipo 3, aunque resulta menos evidente la correlación para los serotipos 1 y 2. Enfoques moleculares similares se encuentran en desarrollo en estos momentos para las vacunas de Sarampión y Fiebre amarilla (33).

### Ensayos para pirógenos

La evaluación de la presencia de pirógenos, grupo heterogéneo de sustancias que inducen fiebre en el humano, se desarrolla tradicionalmente en un modelo animal, mediante el monitoreo de la temperatura corporal en 3 conejos durante 3 horas tras la administración del producto. Este ensayo no constituye un requerimiento para todas las vacunas, en cambio es obligatorio para las vacunas de polisacáridos, antirrábica y contra la encefalitis.

El apego al principio de las 3Rs y ciertas inconsistencias del ensayo de pirógenos llevaron al desarrollo de metodologías *in vitro*, entre ellas el conocido ensayo del Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL), el cual se basa en la coagulación iniciada por endotoxina del lisado preparado a partir de la hemolinfa del llamado cangrejo herradura (*Limulus polyphenus*).

La sensibilidad del LAL es superior a la del ensayo en conejos, lo cual contribuyó a su rápida aceptación en monografías de vacunas como las de hepatitis A, *Haemophilus influenzae* tipo b, influenza, antirrábica, antitifoídica y antiamarilica. No obstante, el LAL no es un ensayo *in vitro* en toda su extensión, pues aunque su ejecución se realiza sin el empleo de animales, se requieren de grandes cantidades del crustáceo *Limulus polyphenus* y otros para satisfacer las demandas de hemolinfa para los juegos de reactivos de LAL.

Por otra parte, es un ensayo que suele dar falsos positivos, ya que algunos componentes de las formulaciones de vacunas suelen ser interferentes. Su principal limitación radica en que aunque es muy específico para lipopolisacáridos, o sea, endotoxinas derivadas de bacterias Gram negativas, no es capaz de detectar otros tipos de pirógenos derivados de bacterias Gram positivas y hongos (34).

En la última década un nuevo ensayo basado en sangre humana ha ido ganando espacio. Su fundamento teórico reside en la liberación de mediadores (IL-1- $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) por parte de los monocitos y macrófagos contenidos en la sangre humana cuando estos interactúan con los pirógenos.

Se conoce que estos mediadores son liberados de forma endógena ante la presencia de sustancias pirogénicas, siendo responsables del incremento de la temperatura corporal en el humano por acción sobre el hipotálamo, por lo que su medición por ELISA constituiría un eficiente indicador de la presencia de pirógenos en los productos evaluados. Entre sus ventajas se cuenta la no restricción a las endotoxinas, permitiendo la evaluación de un mucho más amplio espectro de sustancias pirogénicas, si bien su sensibilidad no supera la del LAL. Como método ha sido reconocido en la Farmacopea Europea como un sustituto del ensayo de pirógenos en conejos y se perfila con un gran potencial para la evaluación de pirógenos en productos bioterapéuticos de nueva generación. Por otra parte, se le ha señalado como una limitación logística la necesidad de sangre fresca para la realización del método, pues tras un período de almacenamiento de la sangre por 8 horas a temperatura ambiente, se produce una liberación espontánea de IL-1- $\beta$ . No obstante, el método ha resultado ser viable y eficaz empleando sangre criopreservada. Igualmente el ensayo suele realizarse en cultivos de líneas de monocitos/macrófagos (35).

### 3. El Enfoque a Consistencia para liberación de lotes

Este enfoque se basa en el actual principio fundamental de la fabricación de vacunas: la producción consistente de lotes de vacuna con características similares a los lotes que han demostrado ser seguros y eficaces en las especies diana. Para algunos productos como es el caso de las vacunas convencionales de polisacáridos, así como las conjugadas, la evaluación de la consistencia ha derivado en la simplificación de los protocolos de liberación de lotes, a partir de que la inmunogenicidad de dichas vacunas es significativamente proporcional a su tamaño molecular. Por tanto, la estimación de la potencia se basa fundamentalmente en la caracterización físico-química en términos de composición, tamaño molecular y contenido antigénico.

En la actualidad se considera que la anterior tendencia es extrapolable a las vacunas tradicionales, por lo que los ensayos de liberación de lotes deben reflejar el nivel de consistencia en la producción alcanzado por la vacuna. De esta manera, el Enfoque de Consistencia implica el uso de un grupo de parámetros que definan un perfil del producto (contenido antigénico, integridad, pureza), capaz de sustituir los ensayos de liberación. Dicho perfil debe asegurar que cada lote liberado sea similar a lotes de vacunas producidos por el fabricante que hayan probado su eficacia y seguridad, según las características

acordadas entre el fabricante y el regulador tras el registro del producto (36).

De igual manera, otros elementos como son la cuidadosa validación y mantenimiento de los procesos de producción y la historia de campo de la vacuna (estudios pre-registro y datos de vigilancia postcomercialización) pueden resultar muy valiosos en la aplicación de este enfoque.

Si bien la aplicación del Enfoque a Consistencia resultaría verdaderamente revolucionario en cuanto a romper con el actual paradigma del extenso y costoso control de calidad para la liberación de lotes de vacunas, así como eliminar o reducir muy significativamente el empleo de animales en los ensayos de potencia y toxicidad que conforman las especificaciones actuales de estos productos, aún no ha resultado posible su extensión más allá de exitosas pruebas demostrativas para algunas vacunas.

Entre los obstáculos principales está el hecho de que muchas vacunas no son biológicos bien caracterizados, por lo que elementos estructurales como la conformación antigénica y otros vinculados al adyuvante y el grado de asociación de este con el antígeno deben ser cuidadosamente monitoreados, brindando argumentos para el mantenimiento de las pruebas de potencia en animales.

Sin embargo, la combinación de ensayos exactos de cuantificación de antígenos en los graneles (que incluye una batería de métodos físico-químicos de avanzada como la espectrometría de masa, el análisis por biosensor, el dicroísmo circular, la espectroscopía de fluorescencia, la resonancia magnético nuclear, la microscopía electrónica, entre otras), el uso de métodos de producción consistentes (monitoreados por controles de proceso adecuados) y ensayos de control de calidad *in vitro* podrían predecir y garantizar la potencia del producto final sin necesidad de la realización del ensayo de potencia *in vivo* (37-38).

## Conclusiones

La incorporación de métodos alternativos al control de calidad rutinario de vacunas posee gran impacto sobre la dinámica de los procesos de producción, liberación de lotes y comercialización de las vacunas, además de aportar significativas ventajas respecto a los procedimientos de control vigentes. Con los progresos alcanzados hasta hoy se requiere el consenso y el esfuerzo conjunto de investigadores, productores y reguladores en actividades de validación y puesta a prueba de dichos métodos a fin de garantizar su adecuada y completa implementación.

## Referencias

1. Kurstak E. New vaccine development, immunisation and immunotherapy. *Vaccine* 2007;25:2960-62.
2. Griffiths E, Knezevic I. Assuring the quality of vaccines: regulatory requirements for licensing and batch release. *Methods in Molecular Medicine*. 2003;87:353-76.
3. Hendriksen CRM. Validation of alternative methods for the potency testing of vaccines. The report and recommendations of ECVAM workshop. *ATLA* 2001;31(26):747-61.
4. Russell WMS, Burch RL. *Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen; 1959.
5. Aldhous P, Coghlan A, Copley J. Let the people speak. *New Scientist* 1999;22:26-31.
6. Hendriksen CFM. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Rev Vaccines* 2008;8:313-22.
7. Relyveld E, Bengounia A, Huet M, Kreeftenberg JG. Antibody response of pregnant women to two different adsorbed tetanus toxoids. *Vaccine* 1991;9:369-72.
8. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of tetanus toxoid vaccines for human use. Parts 1 and 2. Strasbourg: The European Pharmacopoeia Forum; 2002.
9. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of diphtheria toxoid vaccines. Final study report. Strasbourg: The European Pharmacopoeia Forum; 2004.
10. Van der Ark A, van Straaten-van de Kapelle I, Olander RM, Enssle K, Jadhav S, van de Donk H, Hendriksen CFM. The Pertussis Serological Potency Test. Collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. *Biologicals* 2000;28:105-18.
11. Winsnes R, Sesardic D, Daas A, Behr-Gross ME. Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of diphtheria toxoid vaccines-part 2. *Pharmeuropa BIO* 2006;1:73-88.
12. Uhlrich S. Multiplex systems for serology. Proceedings of the International Conference: Alternatives to Animal Testing: New approaches in the development and control of biological, Dubrovnik, April 23-24, 2008. Dubrovnik, Croatia: EDQM, Council of Europe; 2008:111-4.
13. Gupta RK. ELISA for titration of antibodies to tetanus toxoid in sera of immunized guinea pigs as an alternative to the toxin neutralization test in mice. *J Immunol Methods* 1995;179(2):277-79.
14. Marcovistz R, Matos D, Georgini R, Sakauchi D. Potency control of Diphtheria component in adsorbed vaccines by *in vitro* neutralization tests. *Biologicals* 2002;30:105-12.
15. Chovel ML. Development of 3Rs alternatives for determining Potency and Toxicity of vaccines in Cuba: current challenges and research projects in progress. *ALTEX* 2012;29:71-6.
16. Centro para el Control de la Calidad de los Medicamentos y Dispositivos Médicos (CECMED). Anexo I Validación de métodos

- analíticos. Regulación 16-2012 Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. La Habana: CECMED; 2012.
17. Corbel M, Xing DKL. Toxicity and potency evaluation of pertussis vaccines. *Expert Reviews Vaccines* 2004;3:89-101.
  18. Chovel ML, Reyes H. Validation of an in vitro potency test for the Cuban Hepatitis B vaccine. *Dev Biol* 2002;111:305-12.
  19. Giffroy D, Mazy C, Duchene M. Validation of a new ELISA method for in vitro potency assay of hepatitis B-containing vaccines. *Pharmeuropa BIO* 2006;1:7-14.
  20. Rooijakkers EJ, Uittenboogaard JP, Groen J, Osterhaus AD. Rabies vaccine potency control: comparison of ELISA systems for antigenicity testing. *J Virol Methods* 1996;58:111-9.
  21. Bruckner L, Cussler K, Halder M. Three Rs approaches in the quality control of inactivated rabies vaccines. The report and recommendations of ECVAM workshop 48. *ATLA* 2003;31:429-54.
  22. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Alternatives to animal challenge tests in the batch control *Leptospira* vaccines for veterinary use. Strasbourg: The European Pharmacopoeia Forum; 1999.
  23. Bergamin F, Vincent IE, Summerfield A, McCullough KC. Essential role of antigen-presenting role of cell-derived BAFF for antibody responses. *Eur J Immunol* 2007;37:3122-30.
  24. McCullough KC, Hendriksen CFM, Seebeck T. In vitro methods in vaccinology. En: *Veterinary Vaccinology*. Pastoret PP, Blancou J, Vannier P, Verschuereen C (Eds). Amsterdam: Elsevier; 1997. p. 70-112.
  25. VaxDesign Corporation: introducing the MIMICTM System [sitio web]. Orlando FL USA: Sanofi Pasteur VaxDesign Campus; 2018. Disponible en: [www.vaxdesign.com/mimic-technology](http://www.vaxdesign.com/mimic-technology) (Consultado en línea 15 de Septiembre 2018).
  26. Cussler K. A4Rs concept for the safety testing of immunobiologicals. *Dev Biol Stand* 1999;101:21-5.
  27. Gupta RK. Is the test for abnormal toxicity, general safety or innocuity necessary for vaccines?. *Vaccine* 1996;14:1718.
  28. Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, et al. An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine-specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan. *Biologicals* 2009;37: 8-17
  29. Garbe JHO, Ausborn S, Beggs C, Bopst M, Joos A, Kitashova AA, et al. Historical Data Analyses and Scientific Knowledge Suggest Complete Removal of the Abnormal Toxicity Test as a Quality Control Test. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014;103:3349-55.
  30. World Health Organization (WHO). *Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines*. Geneva: WHO; 2013.
  31. Sesardic D, Corran PH, Gee C, Ekong T. In vitro approaches for estimating activity of tetanus toxin as an alternative assay for specific toxicity. En: Balls M, van Zeller AM, Halder ME, (eds). *Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation*. Amsterdam: Elsevier; 2000. p. 969-974.
  32. Behrens-Nicol HA, Bonifas U, Hanschman K-M, Kramer B, Weiber K. Binding and cleavage (BINACLE) assay for the functional in vitro detection of tetanus toxin: applicability as alternative method for the safety testing of tetanus toxoids during vaccine production. *Vaccine* 2013;31:6247-53.
  33. Chumakov KM. Molecular consistency monitoring of oral poliovirus vaccine and other live viral vaccines. *Dev Biol Stand* 1999;100:67-74.
  34. Weisser K, Hechler U, Halder ME, Bottrill K. Animal welfare aspects in the quality control of immunobiologicals. Nottingham: FRAME for ECVAM and PEI; 1997.
  35. Schindler S, Spreitzer I, Loschner B, Hoffman S, Halder M, Hartung M, et al. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. *Journal of Immunology* 2006;316:42-51.
  36. Hendriksen CFM, Arciniega JL, Bruckner L, Chevalier M, Coppens E, Descamps J, et al. The consistency approach for the quality control of vaccines. *Biologicals* 2008;36:73-7.
  37. Metz B, Hendriksen CFM, Jiskoot W, Kersten GFA. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine* 2002;20:2411-30.
  38. Bruysters MWP, Schiffelers M-J, Hoonakker M, Jungbaeck C, Ragan I, Rommel E, et al. Drivers and barriers in the consistency approach for vaccine batch release testing: Report of an international workshop. *Biologicals* 2017;48:1-5.



---

## **Alternative methods as part of the new trends in vaccine quality control**

### **Abstract**

Vaccine quality control is crucial for the manufacturing, lot release and commercialization activities worldwide. However, the current process is by-design too slow and expensive because is based on large animal assays for assuring the potency and safety of these important biological products. The development of 3Rs alternative methods (Reduction, Refinement and Replacement) is a trend able to significantly reduce the releasing times and costs of the vaccine quality control processes in the next few years. Particularly, the replacement of the animals-based potency and toxicity assays by alternative procedures more relevant, fast, accurate, reproducible and cheap, including serology, direct antigen quantification, cell culture tests and the Consistency Approach, for just mentioning some of them, implies a paradigm shift, with undisputable ethical, logistical, economic, scientific and technical repercussions for ensuring the vaccine quality parameters. Theoretical basements, advantages and implementation levels of the alternatives methods as well as their main limitations are presented in this paper.

**Keywords:** Alternative methods, quality control, potency assay, toxicity assay, vaccines.

---

*Recibido: Agosto de 2018*

*Aceptado: Septiembre de 2018*