

## Mejoras en el ensayo de potencia de *Bordetella pertussis*

Carmen Alina del Puerto,\* Aleida Mandiarote, Oriallys Valle, Juan Francisco Núñez, Luis Izquierdo, Nadiezda Baños, Irma Labrador

Instituto Finlay. Ave 27 No. 19805 entre 198 y 202 La Lisa, La Habana, Cuba. AP. 16017, CP 11600.

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

La potencia del componente *pertussis*, presente en la vacuna DPT-vax, se evalúa mediante el ensayo de Kendrick. La cepa recomendada por OMS para este ensayo es *Bordetella pertussis* 18 323, la cual debe ser conservada de manera que se asegure su viabilidad, pureza y virulencia. Como parte de dicho ensayo debe calcularse la concentración de una suspensión de la cepa, cuya opacidad se compara a simple vista con la 5ta Preparación Internacional de Referencia de Opacidad. Este método es muy inexacto y con frecuencia conduce a errores. En este trabajo se elaboró y caracterizó un lote de siembra de *Bordetella pertussis* 18 323; se calculó la concentración de dicha cepa empleando una curva de calibración. El lote se empleó en ocho ensayos de potencia y en los mismos se cumplieron los criterios de validez establecidos.

**Palabras clave:** *Bordetella pertussis*, ensayos de potencia, suspensión de reto.

### Introducción

La tos ferina, causada por la bacteria *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), es aún una causa importante de morbilidad y mortalidad infantil en el mundo. La vacuna *pertussis* de células completas, en combinación con las vacunas de difteria y tétanos contribuyen significativamente a la disminución de la incidencia de la enfermedad.

La potencia del componente *pertussis* presente en las vacunas combinadas se evalúa por el ensayo de Kendrick. Este ensayo se ha utilizado durante años, sin embargo, es técnicamente problemático y todos los criterios para su validez deben cumplirse (1).

La cepa recomendada por la OMS para este ensayo es *B. pertussis* 18 323, la cual debe ser conservada de manera que se mantenga su pureza, viabilidad y virulencia. Como parte de dicho ensayo debe calcularse la concentración de una suspensión de la cepa, cuya opacidad se compara por observación visual con la 5ta Preparación Internacional de Referencia de Opacidad (PIRO) (2).

Este método es muy inexacto y con frecuencia conduce a errores que implican una inadecuada preparación de la suspensión de reto y por tanto la invalidez del ensayo. En años anteriores, aproximadamente el 30% de los ensayos realizados necesitaban ser repetidos por incumplimiento de algún criterio de validez, siendo el más recurrente la baja virulencia de la cepa empleada en el reto.

Por todo lo anterior, nos propusimos como objetivos elaborar y caracterizar un lote de siembra de trabajo de la cepa *B. pertussis* 18 323 para su uso en la prueba de potencia de

*pertussis*, así como calcular la concentración de dicha cepa empleando una curva de calibración y aplicar la misma para estimar la concentración de reto en el ensayo de potencia.

### Materiales y Métodos

**Cepa:** Se empleó la cepa *B. pertussis* 18 323, donada por el Institute of Vaccines and Medical Biologics de Viet Nam.

**Elaboración y caracterización del lote de siembra de trabajo:** El cultivo liofilizado del lote de siembra de referencia se resuspendió con caldo casaminoácidos 1% y se inoculó en placas de agar carbón, las cuales se incubaron a  $35 \pm 1$  °C durante 48 h. Se realizó un pase al mismo medio y se incubó a la misma temperatura durante 20 a 24 h. La biomasa se resuspendió en una solución acuosa de glicerol al 5% (caldo casaminoácidos 1%). Se comprobó la pureza por observación microscópica del cultivo teñido por el método de Gram y se distribuyeron 0,3 mL de la suspensión en criotubos. Se evaluó la viabilidad antes de la congelación mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) por diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$  y siembra en superficie en agar carbón. Se consideró satisfactoria una viabilidad superior a  $10^5$  UFC/mL. El lote se identificó y se almacenó a -70 °C. A la semana de almacenamiento se evaluaron la viabilidad y la pureza del lote.

**Curva de calibración del lote:** A partir del lote de trabajo se realizaron dos pases en agar carbón, los cuales se incubaron como se describió anteriormente.

La biomasa del segundo pase se resuspendió en 6 mL de caldo casaminoácidos 1% y se midió la absorbancia a 625 nm. Esta suspensión se diluyó hasta obtener cinco

\* Licenciada en Microbiología, Máster en Ciencias en Microbiología Clínica.

valores de absorbancia en un rango de 0,05 a 1,5 a intervalos regulares (suspensiones A, B, C, D, E). A partir de cada una de estas suspensiones se realizaron diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y se sembraron en agar carbón, cuatro gotas de 0,02 mL de cada suspensión. Las placas se incubaron durante 96 h a  $35 \pm 1$  °C; se calcularon las UFC/mL para cada dilución. Se evaluó la absorbancia contra UFC/mL para el factor de dilución y se obtuvieron colonias en las cinco suspensiones (A–E). Se calculó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación ( $CR^2$ ) de las curvas de calibración.

**Ensayos de potencia:** Grupos de 20 ratones OF-1 entre 11-15 g de peso se les inoculó con diferentes diluciones de las vacunas a evaluar y de una vacuna de referencia. Estos animales se retaron a los 14 días con una suspensión virulenta de *B. pertussis*, obtenida de un cultivo de 20 a 24 h. Se determinó la concentración de dicha suspensión empleando la fórmula de la pendiente de la curva de calibración ( $y = mx + b$ ). La suspensión concentrada se diluyó con caldo casaminoácidos al 1% para obtener una suspensión de reto que tuviera  $10^6$  bacterias por cada 0,03 mL. A partir de la suspensión de reto se realizaron diluciones 1/50, 1/250 y 1/1250, las cuales se inocularon en ratones para evaluar la virulencia de la cepa mediante el cálculo de la Dosis Letal Media ( $DL_{50}$ ). Se calcularon las células viables en la suspensión de reto. Los ratones se observaron durante 14 días. Se consideró válido aquel ensayo donde la dosis de reto usada tuviera de 100 a 1 000  $DL_{50}/0,03$  mL y el número de viables en 1  $DL_{50}$  no excediera el valor de 300 bacterias (3-5).

## Resultados y Discusión

### Elaboración y caracterización del lote de siembra de trabajo

Se elaboró el lote de siembra de trabajo y se garantizó durante todo el proceso el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Producción (BPP). El lote se elaboró por personal calificado, siguiendo la metodología indicada en el Procedimiento Normalizado de Operación establecido. La preparación se realizó en un ambiente adecuadamente controlado, no se realizó la manipulación de otros materiales biológicos en paralelo, por las mismas personas ni en las mismas instalaciones. Esto implicó la separación temporal y espacial del área de trabajo, con el objetivo de garantizar que no ocurriera contaminación cruzada (6,7). Una vez elaborado el lote, cada criotubo fue cuidadosamente identificado con una etiqueta con los datos siguientes: género y especie, número de la cepa, número del lote y fecha de conservación.

Los criotubos se almacenaron a una temperatura de  $-70$  °C, la cual es adecuada para garantizar su estabilidad a largo plazo (6, 8). El lote de siembra de trabajo no disminuyó la viabilidad posterior a la congelación y se mantuvo en el orden de  $10^8$  UFC/mL. La congelación a  $-70$  °C es el método de preservación cercano al ideal y ha demostrado ser adecuado

para la preservación de un gran número de bacterias (9). De igual modo, la observación microscópica del cultivo demostró la pureza del mismo.

Las cepas virulentas de *B. pertussis* cambian a formas avirulentas cuando son subcultivadas de manera sucesiva en medios artificiales, por lo que el número de pases debe ser minimizado. No existen marcadores que puedan ser usados fácilmente para detectar cambios en la virulencia de los cultivos de este microorganismo. Por tanto, estas cepas deben mantenerse en condiciones que aseguren el mantenimiento a largo plazo de su viabilidad, pureza y virulencia (10).

### Curvas de calibración del lote

En las tres curvas realizadas (Tabla 1) los resultados fueron muy reproducibles, lo que demuestra la buena linealidad entre los valores de absorbancia y recuento de células viables. Mediante el análisis de regresión se obtuvo que en todas las curvas el coeficiente de determinación fue superior al 99%. Por lo que podemos considerar que el uso de este método es adecuado para calcular la concentración de la cepa de reto *Bordetella pertussis* 18 323. La 5ta Preparación Internacional de Referencia de Opacidad (PIRO) consiste en una barra de poliestireno en polimetilmetacrilato y es equivalente a 10 unidades de opacidad (UO), lo cual supone la presencia de  $10^{10}$  bacterias/mL (2, 11). Este patrón solo puede ser usado visualmente, lo que implica que su exactitud dependa de la pericia de la persona que desempeña la técnica.

El cálculo de la concentración de la suspensión bacteriana es un paso muy importante del ensayo, ya que de ahí se deriva la adecuada preparación de la suspensión de reto. Debido a esto se hacía necesaria la sustitución de la calibración empleando el PIRO por un método más exacto y que pudiera ser realizado por personal menos experimentado, lo cual se logró con la curva de calibración empleada.

### Ensayos de potencia

El lote de trabajo elaborado permitió realizar ocho ensayos de potencia, en los cuales se probaron 26 lotes de vacunas (5 de DPT, 3 de Trivac HB y 18 lotes de DPT en estudio de estabilidad). El cálculo de la dosis de reto utilizada en estos ensayos tuvo un intervalo entre 406 y 1 000  $DL_{50}/0,03$  mL. En tres ensayos la mortalidad de los animales fue superior al 50%, lo que avala la calidad del lote de trabajo en cuanto a su virulencia. El número de viables estuvo entre 47 y 300 bacterias. Estos resultados cumplen con los criterios de validez establecidos para el ensayo y también confirman que el cálculo de la concentración de la suspensión de reto fue correctamente estimado empleando la curva de calibración.

El hecho de contar con un lote de siembra de trabajo elaborado según establecen las regulaciones de BPP, así como que la caracterización del mismo evidenció que se

**Tabla 1.** Curvas de calibración de *Bordetella pertussis* 18323.

D.O. (625 nm)	UFC/mL x 10 <sup>6</sup>		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
1,5	4212,5	4950	5612,5
1,14	3475	4137,5	4487,5
0,77	2612,5	2900	3337,5
0,41	1462,5	1517,5	1662,5
0,05	3337,5	187,5	300
Pendiente	2688,7	3345,4	3704,4
Intercepto	338,93	149,16	212,77
R <sup>2</sup>	0,9906	0,9916	0,9936

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

D.O: Densidad óptica

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación

mantienen inalterables la virulencia del microorganismo, su pureza y adecuados niveles de viabilidad, y garantiza el suministro de la cepa necesario para la prueba de potencia durante un largo periodo de tiempo. Por otra parte, el empleo de la curva de calibración en la preparación de la suspensión de reto permitió disponer de una herramienta exacta y de fácil utilización. Todo lo anterior permitió que se mantengan los criterios de validez del ensayo de potencia, evitando la repetición de los mismos con la consiguiente pérdida económica (animales, reactivos, tiempo, etc). Por otra parte, se asegura que el tiempo de respuesta analítico cumpla con el establecido para cada producto.

Concluimos que se elaboró un lote de siembra de trabajo de la cepa *B. pertussis* 18 323 para su uso en la prueba de potencia de *B. pertussis*, cuya caracterización demostró que se mantuvieron inalterables la viabilidad, pureza y virulencia de la cepa. Por lo que la curva de calibración es un método adecuado para calcular la concentración de suspensiones de *B. pertussis* 18 323.

## Agradecimientos

Agradecemos a Regla Sosa, Nayla Salazar, Reinier Valera y Rosario Prieto, del Laboratorio de Pruebas Biológicas de la Vicepresidencia de Calidad del Instituto Finlay, por su valiosa colaboración.

## Referencias

- Xing D, Gaines Das R, O'Neill T, Corbel M, Dellepiane N, Milstien J. Laboratory testing of whole cell pertussis vaccine: a WHO proficiency study using the Kendrick test. *Vaccine* 2002;20:342-51.
- NIBSC. WHO international Standard Opacity 5IRP. London: NIBSC; 2008. Disponible en: [Http://www.who.int/biologicals/en/](http://www.who.int/biologicals/en/)
- Corbel MJ, Xing D. Toxicity and potency evaluation of pertussis vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2004;3(1): 89-101.
- World Health Organization. Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization. Global programme for vaccines and immunization. Vaccine supply and quality. Assay for testing the potency of whole cell pertussis vaccines in monovalent or combined form. Geneva: WHO; 1997.
- WHO. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. Technical Report Series No. 941. Annex 6. Geneva: WHO; 2007.
- WHO. Technical report series, no 961. WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories. Annex 2. Geneva: WHO; 2011.
- Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación 16-2012. Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. La Habana: CECMED; 2012.
- FDA. Code of Federal Regulations Title 21. General Biological Products Standards. Section 610.18 Cultures. Silver Spring, US: FDA; 2002.
- Perry SF. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular Biotechnology* 1998;9:59-64.
- FDA. Preparation of freeze-dried cultures of *Bordetella pertussis*. Center for Biologics Evaluation and Research. Lab. of Pertussis. Silver Spring, US: FDA; 1992.
- Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos No. 594. Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos. 27° Informe. Ginebra: OMS; 1976.

## Improvements in the potency assay of *Bordetella pertussis*

### Abstract

Potency of *pertussis* component, present in DPT-vax, is evaluated by Kendrick assay. Strain *Bordetella pertussis* 18323 is recommended by WHO, which should be stored in a way that ensures its viability, purity and virulence. As part of the assay, the concentration of a strain suspension should be calculated, which opacity is compared at first sight with the Fifth Reference International Preparation of Opacity. This method is very inexact and frequently leads to errors. A seed lot from *Bordetella. pertussis* 18323 was elaborated and characterized in this study and the concentration of the strain using a calibration curve was calculated. The lot was used in eight potency assays and they complied with established validity criterion.

**Key words:** *Bordetella pertussis*, potency assays, challenge suspension.