

Actividad biológica de la vacuna pertussis preservada con análogos estructurales del tiomersal

E. SÁNCHEZ PÉREZ *
M. GONZÁLEZ PACHECO **
H. RODRÍGUEZ GONZÁLEZ ***

Sánchez Pérez, E.; González Pacheco, M.; Rodríguez González, H.: Actividad biológica de la vacuna pertussis preservada con análogos estructurales del tiomersal. Sal. Páb. Méx., XXIII, 591-596, 1981.

Resumen: Estudiamos el efecto de varios análogos del tiomersal sobre la actividad biológica de dos vacunas pertussis producidas una en cultivo estacionario y otra en cultivo sumergido. La prueba de protección activa en el ratón se efectuó para analizar el efecto. También se determinó la concentración de los diferentes análogos en la vacuna completa, sobrenadante y el pa-

quete celular.

Los resultados muestran que existen diferencias en la actividad biológica de la vacuna tratada con los diferentes análogos y se observó además que estos compuestos se encuentran en concentraciones diferentes en las tres fracciones estudiadas.

INTRODUCCION

La vacuna pertussis es una suspensión acuosa de células muertas de *Bordetella pertussis*,¹ la cual se emplea en la profilaxis de la tosferina; esta es una infección respiratoria localizada con manifestaciones específicas de

tos paroxística, linfocitosis y síntomas y características epidemiológicas únicas. Después de un periodo de incubación de 10 a 16 días se presenta un estado catarral y fiebre. Posteriormente desaparece la fiebre y los síntomas característicos de tos paroxística se manifiestan. La tos permanece de cuatro a ocho semanas y puede persistir hasta 20 semanas. La duración de la enfermedad es de 50 a 60 días.²

En las vacunas como en cualquier producto biológico se emplean preservativos para mantener la esterilidad así como la estabilidad del

* Jefe del Laboratorio de Enterovacunas y Productos de Diagnóstico del Instituto Nacional de Higiene, SSA.

** Gerente General de Biológicos y Reactivos, SSA.

*** Ex-Jefe del Laboratorio de Producción de Vacuna Pertussis del Instituto Nacional de Higiene, SSA.

producto. Anteriormente, cuando aún no se empleaban los preservativos, era común la contaminación de los productos. En el libro titulado *The Hazards of Immunization* Graham S. Wilson³ relata detalles de varias vacunaciones en las cuales las infecciones y muertes fueron causadas por productos contaminados, distribuidos en dosis múltiples que no contenían preservativo. En estas circunstancias podemos mencionar a *Clostridium tetani* en la antitoxina diftérica en 1900³ y *Staphylococcus aureus* en la vacuna tifóidica en 1916.³ Fue en 1931 cuando se empleó por primera vez el tiomersal como preservativo,⁴⁻⁶ también conocido como merthiolate y thimerosal, que son nombres propietarios o registrados, mientras que el empleado en este trabajo es el no propietario propuesto internacionalmente por la OMS.⁷ El nombre químico de este compuesto es el de etilmercuritiosalicilato de sodio y su fórmula se encuentra en el cuadro 1 de este trabajo. Tiene un peso molecular de 404.84 y su contenido de mercurio es 49.55%.⁸ Powell y Jamieson^{5,6} establecieron que el tiomersal es tan efectivo como el fenol sobre *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*, y con el uso de éste se han evitado muchas contaminaciones, ya que puede emplearse tanto para prevenir el crecimiento como para matar a los microorganismos ya presentes que se pudieran introducir durante el proceso de producción o durante la aplicación del producto.³ Aun en productos que son esterilizados por filtración puede haber contaminaciones que alteren la pureza, incrementen la toxicidad e incluso puede aparecer pirogenicidad. De aquí que el uso de preservativos al prevenir la multiplicación de microorganismos contaminantes proteja la calidad del producto.

El uso de preservativos establecidos hasta ahora, es biológicamente seguro para el hombre y no afecta adversamente al producto. Sin embargo, por la adición de los preservativos a éstos, en algunos casos se presentan problemas ya que en presencia de varios componentes biológicos forman precipitados y decoloraciones que alteran la apariencia del producto; además incrementan la dificultad para hacer pruebas válidas de esterilidad.³

El tiomersal se agrega a algunas vacunas víricas⁹ así como a algunas vacunas bacterianas muertas, entre las cuales está la vacuna pertussis; ya hace algún tiempo se sabe que este es el mejor preservativo para esta vacuna. Esto se vio confirmado por los trabajos de Gardner y Pittman¹⁰ en los cuales estas autoras compararon al tiomersal con el cloruro de benzalconio y los parabenos (metil y propil-p-hidroxibenzoato); este estudio lo hicieron debido a que por muchos años se ha empleado la vacuna pertussis en combinación con los toxoides diftérico y tetánico, lo cual constituye la vacuna triple (DPT). En esta vacuna se comprobó su estabilidad durante varios años de uso, sin embargo, hace unos pocos años la vacuna antipoliomielítica inactivada se combinó con la vacuna DPT para producir la vacuna DTPP, y las condiciones de ésta se ajustaron para que resultaran óptimas para la vacuna antipoliomielítica que es la menos estable, pero entonces la vacuna pertussis empezó a perder estabilidad; la diferencia entre la vacuna DPT y la DTPP está en el preservativo empleado. Al menos desde el establecimiento de un estándar de potencia en 1949 el tiomersal se ha empleado en la DTP, pero no se usó en la DTPP porque los iones libres de mercurio son nocivos para la potencia vacunal del virus de la poliomiélitis; mediante estos estudios se comprobó que la presencia de cloruro de benzalconio y la ausencia de tiomersal fueron razones muy importantes para la inestabilidad de la vacuna pertussis en DTPP.

El objetivo de este trabajo es establecer la influencia que sobre la toxicidad y la potencia de la vacuna pertussis tienen los análogos estructurales del tiomersal, los cuales son:

m = etilmercuritiosalicilato de sodio (análogo meta).

p = etilmercuritiosalicilato de sodio (análogo para).

etilmercuritiosalicilato de sodio (análogo lineal).

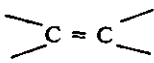
Sus características químicas son semejantes (cuadro 1), y se emplearon en condiciones semejantes a las del tiomersal.

Cuadro I

CARACTERIZACION QUIMICA DEL TIOMERSAL Y SUS ANALOGOS

CARACTERISTICA	TIOMERSAL	*METATIOL BENZOICO	*PARATIOL BENZOICO	*ETILMERCUROTIOGLICOLICO
PUREZA		97	95	95
RENDIMIENTO		35	70	60
PUNTO DE FUSION (°C)		247	226-228	237
PESO MOLECULAR (DALTONS)	404.8	382	382	320.6
SOLUBILIDAD	Agua	DMS, Dioxano (parcial) Ciclohexano, MeOH	DMS, Dioxano (parcial) Ciclohexano, MeOH	DMS, Acetona (parcial) Heptano, MeOH

INFRARROJO (cm⁻¹)

Radicales en posición Orto, Meta y Para	COOH		—CH ₃	—CH ₂	C—S
825 — 790	2,950 — 1,710	1,580	2,895	1,475 a 2,810	675

* Estos ácidos fueron tratados con hidruro de sodio para formar las sales correspondientes

MATERIAL Y METODOS

1. *Obtención de vacuna para el estudio.* Se preparó una vacuna en cultivo estacionario por el método de Cohen-Wheeler,¹¹ empleando las cepas 10,536 y 22,402 de *Bordetella pertussis*. Y una vacuna en cultivo sumergido por el método de Stainer,¹² para lo cual se emplearon las cepas 509 y 134 de *Bordetella pertussis*.

2. *Adición del conservador.* El lote de vacuna obtenida en cultivo estacionario fue centrifugado tres veces con solución salina para lavar el paquete celular; éste se dividió en cinco sublotos y a cada uno de ellos se le agregaron los siguientes conservadores: tiomersal (Eli-Lyly & Co.), análogo *meta*, análogo *para* y análogo lineal del tiomersal. Estos análogos fueron obtenidos en forma experimental en el Laboratorio de Química Orgá-

nica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Los conservadores fueron agregados a una concentración final de 1:10,000. Un sublote de vacuna se dejó sin conservador.

Las vacunas obtenidas en medio líquido fueron precipitadas con ácido cítrico y después se siguió el mismo procedimiento que para las vacunas en cultivo estacionario.

3. *Determinación de las unidades de opacidad.* Todas las fracciones de vacuna fueron ajustadas a 10 UIOP (Unidades Internacionales de Opacidad) según un patrón internacional de referencia,¹³ con objeto de estandarizarlas en las condiciones habituales de trabajo.

4. *Titulación del conservador.* Cada uno de los sublotos de vacuna se separaron en tres partes: vacuna completa, paquete celular y sobrenadante, a los cuales se les hicieron de-

Cuadro 2

DETERMINACION DE MERCURIO EN LAS DIFERENTES FRACCIONES DE LA VACUNA PERTUSSIS

SUBLOTE DE VACUNA	CONCENTRACION DE MERCURIO (mg/ml) FRACCIONES		
	Vacuna completa	Sobrenadante	Paquete celular
Sin conservador	0.0	0.0	0.0
Con tiomersal (ORTO)	680.0	559.0	35.97
Con análogo (META)	62.0	33.0	25.9
Con análogo (PARA)	95.0	67.9	30.11
Con análogo (LINEAL)	500.0	100.0	0.0

terminaciones de mercurio empleando un espectrómetro de absorción atómica.

5. *Prueba de toxicidad.* Se determinó el bajo incremento de peso del ratón por el método de Pittman y Cox.¹⁴ La prueba se efectuó en ratones de 14 a 16 g de la cepa CFW. Se realizaron tres pruebas para cada sublot de vacuna, excepto en la vacuna obtenida en cultivo sumergido, tratada con análogo lineal y análogo para, a las cuales se les efectuaron cuatro pruebas.

6. *Prueba de potencia.* Se efectuó a cada uno de los grupos de vacuna usando el método de Kendrick.¹⁵ La prueba se hizo en ratones CFW de 12 a 14 g y la determinación de la DE₅₀ se efectuó por el método estadístico de Wilson y Worcester.¹⁶

RESULTADOS Y DISCUSION

La vacuna preparada por los métodos descritos se trató con los diferentes análogos. Todas las preparaciones se ajustaron a 10 UIOP con el objeto de estandarizarlas en las condiciones habituales de trabajo.

Tomando en cuenta las diferencias químicas que existen entre los análogos (cuadro 1), se consideró necesario hacer una determinación cuantitativa de éstos y los resultados se

muestran en el cuadro 2.

Es interesante observar que la concentración del conservador en la vacuna con el análogo lineal sólo existió en el sobrenadante a diferencia de las otras vacunas en que existió tanto en el sobrenadante como en el paquete celular.

La prueba de toxicidad de los cinco sublot de vacunas, tanto las producidas en cultivo estacionario como las de cultivo sumergido (cuadro 3), muestra que todas fueron atóxicas teniendo en todos los casos un incremento promedio de peso por ratón mayor de 60% con respecto a los testigos, como propone para esta prueba Van-Ramshorst.¹⁷

La potencia de los cinco sublot de vacuna (cuadro 4) muestra que los producidos por cultivo sumergido presentan, todos ellos, potencia entre 8.8 y 13.3 y en el caso de la vacuna en cultivo estacionario con el análogo lineal se observa una potencia elevada, mientras que en la vacuna con tiomersal y sin conservador no rebasan las ocho UP/ml, que es el requerimiento mínimo de potencia de esta vacuna. Esta prueba relacionada con la localización del conservador, ya sea en la vacuna completa, sobrenadante o paquete celular, no muestra una concordancia entre ellas, ni con la toxicidad.

Cuadro 3

PRUEBA DE TOXICIDAD DE VACUNA PERTUSSIS

Etapas de la prueba	Condiciones del cultivo	SUBLOTES DE VACUNA CON DIFERENTES CONSERVADORES				
		Análogos				
		Meta	Para	Lineal	Tiomersal	* Testigos
Relación de ratones (muertos/total)	Estacionario	0/60	**	1/60	0/60	0/30
	Sumergido	1/60	4/80	4/80	1/60	0/40
Incremento promedio de peso/ratón a las 72 horas (g)	Estacionario	1.54	**	2.36	2.63	3.4
	Sumergido	2.54	2.34	3.34	2.18	3.18
Incremento promedio de peso/ratón a los 7 días (g)	Estacionario	4.71	**	5.12	4.82	5.83
	Sumergido	4.29	4.32	5.27	4.29	5.62
Incremento promedio de peso/ratón (%)	Estacionario	80.8	**	87.9	82.7	100.0
	Sumergido	82.3	76.9	93.8	76.3	100.0

* Vacuna sin conservador.

** Valores no obtenidos.

NOTA: Los datos presentados son valores de la media geométrica de pruebas independientes

Cuadro 4

PRUEBA DE POTENCIA DE LA VACUNA PERTUSSIS ADICIONADA DE DIFERENTES CONSERVADORES

SUBLOTE DE VACUNA	TIPO DE CULTIVO/POTENCIA (UP/ml)	
	ESTACIONARIO	SUMERGIDO
CON TIOMERSAL	1.65	8.9
CON ANALOGO META	*	9.3
CON ANALOGO PARA	*	12.96
CON ANALOGO LINEAL	11.77	13.39
SIN CONSERVADOR	7.74	8.81
ESTANDAR **	8.0	8.0

* Valores no obtenidos.

UP/ml unidades protectoras por mililitro.

** Vacuna de referencia.

Sánchez Pérez, E.; González Pacheco, J.; Rodríguez González, H.: Biological activity of Pertussis vaccine treated with analogs of thiomersal. Sal. Púb. Méx., XXIII, 591-596, 1981.

Summary: We studied the effect of some thiomersal analogs in the biological activity of two Pertussis vaccines produced one in static and the other in submerged culture. The activity protection test in mice was done in order to make the study. Also we assayed the concentration of the different analogs in the whole vaccine,

supernant and the cellular bulk.

The results show that there are differences in the biological activity of the vaccine treated with different analogs and the concentration of these analogs is not homogeneously distributed in the three fractions studied.

REFERENCIAS

1. Normas para la vacuna antipertussis. Organización Mundial de la Salud. Serie de informes técnicos No. 274, Ginebra, 1964, págs. 25-41.
2. Mudd, S.: Infectious agents and host reactions, 1a. ed., W. B. Saunders Co. Londres, págs. 239-265, 1970.
3. International Symposium on Preservatives in Biological Products San Francisco. Develop. Biol. Standard., vol. 24, 1973.
4. Davisson, E. O., Ph. D., Powell, H. M., MacFarlane, J. O., Hodgson, R., Stone, R. L., Culbertson, C. G.: The preservation of poliomyelitis vaccine with stabilized merthiolate. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 47(8), 8-19, 1950.
5. Lawrence, C. A., Block, S. S.: Disinfection, sterilization, and preservation. Lea Febiger. Philadelphia, 348-371, 1968.
6. Powell, H. M. y Jamieson, W. A.: Merthiolate as a germicide. *Am. J. Hyg.*, 13, 296-310, 1931.
7. World Health Organization. International Nonproprietary Names. Cumulative List No. 3. Geneva, pág. 129, 1971.
8. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. Eight Edition. Published by Merck & Co., Inc. Rahway, N. J., U.S.A., pág. 1040, 1068.
9. Micklem, L. R., Kaplan, C.: The influence of thiomersalate on vaccinia virus. *Virology*, 6(3), 775-777, 1958.
10. Gardner, R. A. y Pittman, M.: Relative stability of pertussis vaccine preserved with merthiolate, benzethonium chloride, or the parabens. *Applied Microbiology*, 13(4), 564-569, 1965.
11. Cohen, S. M. y Wheeler, M. W.: Pertussis vaccine prepared with phase I cultures grown in fluid medium. *American Journal of Public Health*, 36, 371-376, 1946.
12. Stainer, W. D. y Scholte, M. J.: A simple chemically defined medium for the production of Phase I of *Bordetella pertussis*. *J. of General Microbiology*, 63, 211-220, 1970.
13. Maaloe, O.: The International Reference Preparation of opacity, *Bull World. Health. Org.*, 12:769-775, 1955.
14. Pittman, M. y Cox, B. C.: Pertussis vaccine testing for freedom from toxicity. *Applied Microbiology*, 13(3), 447-456, 1965.
15. Kendrick, P. L., Eldering, G., Dixon, M. K. y Misner, J.: Mouse protection tests in study of pertussis vaccine: comparative series using intracerebral route for challenge. *Am. J. Public Health*, 36, 803-810, 1947.
16. National Institutes of Health. Application of the method proposed by Wilson and Worcester for determining the ED₅₀ to the evaluation of the potency of pertussis vaccine. Bethesda, Maryland. January 2, 1948.
17. Van-Ramshorts, D. J.: Toxicity control of pertussis vaccines by the mouse weight gain test. Datos no publicados.