



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores "CUAUTITLAN"

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
UNA VACUNA PERTUSSIS CELULAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A N:

Nieves Mireya González Cortés
Danya Leticia González Sandoval
Ana Catalina Peña Olguín



Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

GLOSARIO	(1)
RESUMEN	(2)
INTRODUCCION	(5)
-Características generales del agente etiológico	(6)
-Características generales de la enfermedad	(7)
-Componentes con actividad biológica de <u>B.pertussis</u>	(8)
-Factores de virulencia de <u>B.pertussis</u>	(20)
-Interacción huésped- parásito	(22)
-Respuesta a la terapia con suero y antibióticos	(23)
-Modelo animal para el estudio de la infección experimental. (23)	
-La vacuna contra la tosferina	(25)
-Producción de la vacuna pertussis	(27)
-Control de calidad de la vacuna pertussis	(29)
OBJETIVOS	(32)
METODOLOGIA	(34)
A. Relacion entre el factor promotor de leucocitosis y las - pruebas de toxicidad	(35)
A.1. Muestras	
A.2. Análisis	
A.2.1. Prueba de toxicidad	
A.2.2. Factor promotor de Leucocitosis	
B. Efecto de la concentración celular en la actividad de FPL (38)	
B.1. Muestras	
B.2. Análisis	
B.2.1. Unidades de Opacidad	
B.2.2. Factor promotor de leucocitosis	

C. Evaluación de la actividad del Factor promotor de leucocitosis durante la producción de la vacuna pertussis	(39)
C.1. Obtención de las muestras	
C.2. Detoxificación de las muestras	
C.3. Análisis	
C.3.1. Actividad de toxina dermonecrótica	
C.3.2. Factor promotor de leucocitosis	
D. Efecto de agentes químicos sobre la detoxificación de la - vacuna pertussis	(41)
D.1. Muestras	
D.2. Tratamiento de las muestras	
D.2.1. Agentes químicos	
D.2.2. Tratamiento térmico	
D.3. Análisis	
D.3.1. Prueba de toxicidad	
D.3.2. Factor promotor de leucocitosis	
D.3.3. Toxina dermonecrótica	
D.3.4. Factor sensibilizante a la histamina	
RESULTADOS	(43)
A. Relación entre el Factor promotor de leucocitosis y la prueba de toxicidad	(44)
B. Efecto de la concentración celular en la actividad del factor promotor de leucocitosis	(58)
C. Evaluación de la actividad del Factor promotor de leucocitosis durante la producción de la vacuna pertussis	(77)
D. Efecto de agentes químicos sobre la detoxificación de la - vacuna pertussis	(86)

DISCUSION	(92)
CONCLUSIONES	(102)
BIBLIOGRAFIA	(105)

INDICE

(ESQUEMAS, TABLAS Y FIGURAS)

TABLA I	Factores de Virulencia de <u>B.pertussis</u>	(21)
ESQUEMA I	Etapas de producción de la vacuna pertussis (INH)	(28)
Tabla 1	Relación entre toxicidad y leucocitosis para el grupo I (no tóxico)	(45)
Tabla 2	Relación entre toxicidad y leucocitosis para el grupo 2 (tóxico)	(46)
Tabla 3	Relación entre toxicidad y leucocitosis para diferentes grupos - que corresponden a un mismo lote fraccionado en varias muestras	(48)
Tabla 4	Relación entre toxicidad y leucocitosis para diferentes grupos - que corresponden a iguales lotes con diferente tratamiento térmico	(53)
Tabla 5	(58)
Tabla 6	Efecto de la concentración celular sobre la actividad del FPL de <u>B.pertussis</u> cepa 165	(60)
Tabla 7	Efecto de la concentración celular sobre la actividad del FPL de <u>B. pertussis</u> cepa 134	(61)
Tabla 8	Efecto de la concentración celular sobre la actividad del FPL de <u>B.pertussis</u> cepa 509	(62)
Tabla 9	Actividad de TDN durante el proceso de producción de vacuna pertussis utilizando lotes con y sin tratamiento térmico de cepas - 134, 509 y 165	(78)
Tabla 10	Actividad de FPL durante el proceso de producción de Vacuna pertussis con la cepa 134	(79)
Tabla 11	Actividad de FPL durante el proceso de producción de Vacuna pertussis con la cepa 509	(81)

Tabla 12	Actividad de FPL durante el proceso de producción de Vacuna pertussis con la cepa 165	(84)
Tabla 13	Efecto de la detoxificación de agentes químicos sobre la actividad de FPL, en un lote de vacuna pertussis	(88)
Tabla 14	Efecto de la detoxificación de agentes químicos sobre la actividad de FSH en un lote de vacuna pertussis	(89)
Tabla 15	Efecto de la detoxificación de agentes químicos sobre la prueba de toxicidad aplicada a un lote de vacuna pertussis	(90)
Tabla 16	Efecto de la detoxificación de agentes químicos sobre la actividad de TDN en un lote de Vacuna pertussis	(91)
Figura 1	Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertussis, muestras de un mismo lote fraccionadas en diferentes garrufones	(50)
Figura 2	Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertussis, muestras de un mismo lote fraccionadas en diferentes garrufones	(51)
Figura 3	Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertussis, muestras de un mismo lote fraccionadas en diferentes garrufones	(52)
Figura 4	Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertussis, muestras que han recibido diferente tratamiento térmico	(56)
Figura 5	Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertussis, muestras que han recibido diferente tratamiento térmico....	(57)
Figura 6	Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertussis (muestra B-1) cepa 165. Dif. conc. celulares.....	(64)

- Figura 7 Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertu -
 ssis (muestra B-2) cepa 165 a dif. conc. celulares (65)
- Figura 8 Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertu -
 ssis (muestra B-4) cepa 134 a dif. conc. celulares (66)
- Figura 9 Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertu -
 ssis (muestra B-5) cepa 134 a dif. conc. celulares (67)
- Figura 10 Leucocitosos producida en ratones inoculados con vacuna pertu -
 ssis (muestra B-7) cepa 509 a dif. conc. celualres (68)
- Figura 11 Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertu -
 ssis, (muestra B-9_ cepa 509 a dif. conc. celualres..... (69)
- Figura 12 Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertu -
 ssis (muestra B-11) cepa 509 a dif. conc. celulares..... (70)
- Figura 13 Leucocitosis producida en ratones inoculados con muestras de va
 cuna pertussis de las cepas 134, 509 y 165 a una concentraci^on-
 celular de 5UOP (71)
- Figura 14 Leucocitosis producida en ratones inoculados con muestras de va
 cuna pertussis de las cepas 134, 509 y 165 a una concentraci^on-
 celular de 7 UOP (73)
- Figura 15 Leucocitosis producida en ratones inoculados con muestras de va
 cuna pertussis de las cepas 134,509 y 165 a una concentraci^on-
 celular de 9 UOP (74)
- Figura 16 Leucocitosis producida en ratones inoculados con muestras de va
 cuna pertussis de las cepas 134, 509 y 165 a una concentraci^on-
 celular de 11 UOP (75)
- Figura 17 Leucocitosis producida en ratones inoculados con muestras de va
 cuna pertussis de las cepas 134, 509 y 165 a una concentraci^on-
 celular de 13 UOP (76)

- Figura 18 Leucocitosis producida en ratón al quinto día, durante el proceso de producción de vacuna pertussis con la cepa 134 (80)
- Figura 19 Leucocitosis producida en ratón al quinto día, durante el proceso de producción de vacuna pertussis con la cepa 509 (82)
- Figura 20 Leucocitosis producida en ratón al quinto día, durante el proceso de producción de vacuna pertussis con la cepa 165 (85)

(1)

GLOSARIO

CÉL : Células
FHA : Hemaglutinina filamentosa
FPL : Factor promotor de leucocitosis
FSH : Factor sensibilizante a la histamina
G : Garrañón
HTL : Toxina lábil al calor
INH : Instituto Nacional de Higiene
Leuc : Leucocitos
LPS : Lipopolisacárido
ml : mililitros
mm³ : milimetro cúbico
OMS : Organización mundial de la salud
PMNs : Polimorfonucleares
TDN : Toxina dermonecrótica
UOP : Unidades de opacidad
 \bar{X} : Promedio

A, B, C y D: En el presente trabajo se utilizaron lotes de producción del INH tanto de la producción de rutina como de los lotes piloto; para evitar el uso de las claves de este instituto, se decidió clasificar los lotes como A, B, C y D seguidos de un número de acuerdo a la parte de experimentación en que fueron usados.

(2)

RESUMEN

(3)

RESUMEN

La necesidad de una vacuna pertussis menos reactogénica, impulsó la elaboración de este trabajo que abarcó la descripción de cuatro aspectos importantes en el estudio de esta vacuna.

Primeramente se analizó la relación entre el factor promotor de leucocitosis las pruebas de toxicidad, aplicando a ratones la prueba de toxicidad normalmente empleada en el control de calidad y la prueba del factor promotor de leucocitosis, y comparando los resultados de 57 lotes analizados. Los resultados se agruparon en lotes tóxicos y atóxicos de acuerdo al criterio de toxicidad de la prueba de rutina y mostraron comportamientos heterogéneos en ambos grupos. Varios lotes correspondían a un sólo lote original con diferente tratamiento térmico por lo que se separaron en diferentes grupos los cuales mostraron un comportamiento semejante pero con diferente intensidad en la prueba de FPL, con algunas variaciones. Los grupos mostraron disminución de la leucocitosis con el tratamiento térmico, pero las muestras con alta leucocitosis difícilmente disminuyeron sus cantidades con el calentamiento.

En segundo lugar se estudió el efecto de la concentración celular en la actividad del factor promotor de leucocitosis en donde en 11 muestras se llevaron a cabo diluciones seriadas de 13 a 5 UOP; estas muestras correspondían a diferentes muestras celulares la 134, 165 y 509. Mostraron, un comportamiento de máxima leucocitosis, en su mayoría al quinto día de inoculación y una disminución paulatina hasta el séptimo día. La mayor toxicidad se vió a las 12 y 13 UOP y la mínima toxicidad a las 5 y 6 UOP. La cepa menos reactogénica fué la 165.

En tercer planó se evaluó la actividad del factor promotor de leucocitosis durante la producción de la vacuna pertussis por medio del seguimiento de 13 lotes de diferentes cepas, cada 5 horas durante su producción, y analizándolas

después de una detoxificación a 56°C por 25 minutos para eliminar la TDN. La cepa 134 mostró una elevación máxima del FPL a las 10 horas de producción, para la cepa 509 la elevación máxima fué de las 30 a las 35 horas y para la 165 a las 35 horas; aunque estas dos últimas cepas mostraron valores muy similares a lo largo de todo el proceso.

Y por último se determinaron los efectos de agentes químicos sobre la detoxificación de la vacuna pertussis, evaluando la toxicidad, el FPL, la TDN y el FSH, a un lote tratado con diferentes agentes químicos. El lote se dividió y se le dió tratamiento con glutaraldehído al 0.25%, glutaraldehído al 0.5%, acetona, beta-propiolactona además del tratamiento térmico a 56°C por 30 minutos. El glutaraldehído mostró los menores valores en la prueba de FPL, no tuvo actividad de FSH ni de TDN y fué atóxico en la prueba de toxicidad.

En conclusión, los resultados mostrarón que no existe una relación directa entre la toxicidad evaluada por la prueba de Pittman y Cox y la determinada por el FPL debido a las variaciones biológicas del primer método.

A mayor concentración celular se encontró mayor leucocitosis en los animales estudiados, con preparaciones diluídas, por lo tanto al disminuir la concentración celular se disminuye la toxicidad.

La evaluación de la toxicidad por el método de FPL resulta ser más precisa y con grandes posibilidades para implementarse en lugar de la de Pittman y Cox. La cepa vacunal más activa fué la 134. La cepa 165 es una cepa promisoría para la producción de la vacuna pertussis y requiere mayor atención para su completo conocimiento.

La mayor actividad de FPL se encontró entre las 10 y 35 horas de producción y requiere además, del uso de parámetros adicionales.

Es promisorio el uso de glutaraldehído como agente detoxificador de la vacuna.

(5)

INTRODUCCION

La tosferina es una enfermedad producida por Bordetella pertussis que si -
gue siendo un problema de salud pública en muchos países del mundo; los efectos
que produce la enfermedad, los factores de virulencia y los componentes con ac-
tividad biológica del agente etiológico además de la prevención de la enferme -
dad, han sido estudiados para mostrar que tanto B.pertussis como las vacunas de
células completas poseen en común la mayoría de los componentes con actividad -
biológica, sólo que en la vacuna la actividad está reducida. Esta relación ha -
sido usada no sólo para el conocimiento de la enfermedad sino también para el -
mejoramiento de las vacunas actuales,

CARACTERISTICAS GENERALES DEL AGENTE ETIOLOGICO

Bordetella pertussis es un cocobacilo gram negativo, que mide de 0.2 a 0.3
 μm de ancho por 0.5 a 1.0 μm de largo, lo podemos encontrar sólo o en pares y -
ocasionalmente en cadenas cortas.

Las colonias en el medio de Bordet Gengou (agar-sangre-papa-glicerol) son-
medianas, lisas, convexas, perladas brillantes y ligeramente transparentes, ro-
deadas de una zona de hemólisis sin periferia definida; tienen una cubierta si-
milar a una cápsula, perdiendo la capacidad de formarla debido a su adaptacióm-
en medios de cultivo comunes en el Laboratorio.

Es no fermentativa, catalasa positivo, indol negativo, no licua la gelatin-
na, leche tornasol alcalino y es aerobio estricto. La gran mayoría de las cepas-
requieren para crecer ácido nicotínico, cisteína y metionina. Utiliza oxidativa
mente a la alanina, asparagina, ácido glutámico, prolina y serina; no requiere-
a la coenzima I (factor V) ni a la hemina (factor X) para su crecimiento, sien-
do su temperatura óptima de crecimiento entre 35 y 37°C. (5)

Las Bacterias del género Bordetella son patógenos de importancia significa-
tiva en enfermedades respiratorias de niños y animales. B.pertussis y B.paraper

(7)

tussis aparentemente infectan sólo a humanos, B. bronchiseptica infecta a muchos mamíferos y ocasionalmente al ser humano. (34)

El método de aislamiento del microorganismo a partir de la nasofaringe consiste en una transferencia directa, con un hisopo estéril, de un raspado de las paredes interiores y profundas de la nariz, a una caja de petri conteniendo medio de cultivo adecuado y el cual debe inhibir microorganismos comensales, empleando para esto generalmente penicilina y diamidina. La incubación se hace a 35-36°C durante 3 a 4 días. Algunas veces las colonias no son identificables a los 3 días de incubación, sino hasta el séptimo día. La morfología de las colonias es una característica principal para su diagnóstico. (34)

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ENFERMEDAD

B. pertussis produce la enfermedad conocida como tosferina y es específicamente severa en niños pequeños. Un caso típico de tosferina se caracteriza por tres fases, que se presentan después de que un individuo susceptible (especialmente un niño no inmune), es expuesto al organismo. Los síntomas aparecen de cinco a siete días después de esta exposición.

La fase catarral es la primera que se presenta, y sus síntomas son similares a un resfriado común, pero asociado con rinorrea, conjuntivitis y tos benigna aproximadamente durante una semana. B. pertussis puede ser aislada en cultivo nasofaríngeo en una proporción del 90% de los casos, sin embargo B. pertussis no es considerada en el diagnóstico de una enfermedad respiratoria, dada la ausencia de características típicas de tosferina, y no se realiza cultivo en Bordet-Gengou a menos que se reconozca que hubo exposición al microorganismo. (44)

Después de los primeros siete a diez días se presenta la fase denominada paroxística, ya que se presentan accesos de tos de este tipo en número de diez a veinte. El paciente suele presentar cianosis y vómito después del acceso, ad

(8)

más de cambios patofisiológicos como leucocitosis (linfocitosis), pérdida de peso, hipoglucemia (la toxina pertussis modifica el metabolismo de la glucosa o la producción de insulina en animales), y puede o no presentarse fiebre. (13) (36)

Como última etapa se presenta la convalescencia, la recuperación dependerá de la gravedad y curso de la enfermedad. La duración promedio de la enfermedad es de cincuenta a sesenta días. La infección se transmite por medio de las gotas eliminadas al toser o estornudar de los individuos en la fase catarral o durante la primera semana de la fase paroxística. (33)

Es importante mencionar que la imposibilidad de cultivar al microorganismo durante la fase paroxística (el más severo de los estados de la enfermedad) nos orienta hacia la hipótesis de que está implicada la actividad de una toxina o producto bacteriano de acción duradera, que se disemina sistemáticamente pero el organismo no invade sangre. (36)

Algunos autores consideran que la toxina o toxinas son producidas por B. pertussis cuando ésta se localiza en los cilios del epitelio del tracto respiratorio, adherida por medio de sus pili. (36)

COMPONENTES CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE B. pertussis

Las actividades biológicas de B. pertussis dependen de un componente que induce un efecto básico, bioquímicamente específico. Cada evento se atribuye a las actividades de un componente bacteriano distinto, con un mecanismo de acción diferente. Los componentes de B. pertussis con actividad biológica se describen a continuación:

- Toxina adenilato ciclasa

Las especies de Bordetella producen esta enzima que tiene diferentes propiedades. Al menos dos formas de la adenilato ciclasa de B. pertussis han sido

identificadas: La primera denominada enzima adenilato ciclasa tiene sólo actividad enzimática, que es posible medir in vitro y no tiene efecto sobre células eucarióticas. La segunda, denominada toxina adenilato ciclasa, posee actividad enzimática, pero además tiene la capacidad para entrar en las células eucarióticas y catalizar la conversión de ATP endógeno hacia AMPc. (43)

-Aglutinógenos

Los aglutinógenos fueron definidos serológica y operacionalmente como los determinantes de superficie que producen anticuerpos y pueden aglutinar a la bacteria íntegra. Para servir como aglutinógenos dichos antígenos deben estar unidos a la superficie y presentes en cantidad suficiente para que los anticuerpos bivalentes puedan formar enlaces cruzados con dos bacterias a la vez. Preston (1982) concluyó que los serotipos 1, 2 y 3 fueron los mejores aglutinógenos y después de éstos los 4, 5 y 6. (43)

-Toxina dermonecrótica

La toxina lábil al calor (HTL) o toxina dermonecrótica (TDN) de B. pertussis causa lesión necrótica cuando es inyectada subcutáneamente en ratón a bajas dosis y es letal a dosis elevadas. Se ha reportado su localización en el citoplasma del organismo (8), y datos recientes indican que alguna porción de la toxina está expuesta en la superficie. Nakase y Endon purificaron la toxina y determinaron que su peso molecular es de 102Kd con subunidades de 24 y 30 Kd. La toxina inhibe la actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa. El mecanismo de acción no es claro aún. (44) Por medio del calentamiento a 56°C de los cultivos, se destruye la actividad biológica de esta toxina, y además se distingue del lipopolisacárido (LPS), el cual es termoestable. Por lo tanto, la actividad tóxica reside intracelularmente. (24)

-Hemaglutinina Filamentosa

La hemaglutinina filamentosa (FHA) es una proteína en forma de varilla. -

Es llamada así por su capacidad para aglutinar una variedad de eritrocitos. En las etapas tempranas del crecimiento en medio líquido, la FHA está asociada a las células, pero más tarde en su crecimiento la mayor cantidad se localiza en el medio extracelular. (40) (44) Al examinar bajo el microscópio electrónico la superficie de B.pertussis en fase I, se ha encontrado la presencia de filamentos finos pertenecientes a los pili. Estos se localizan adheridos a las células en los estadios tempranos del cultivo en medio líquido o sólido. Después de 24 horas de crecimiento, los pili son escasos en la superficie de las células aumentando su concentración en el medio de cultivo (24) (28).

El incremento en el medio de cultivo de pili y FHA no es debido a la lisis celular, pero sí un poco a la pérdida natural y tal vez a algunos estados del ciclo de crecimiento, así como a una síntesis desequilibrada, un evento que parece afectar la membrana celular de B.pertussis. El líquido sobrenadante del crecimiento de B.pertussis contiene FHA que induce inmunidad activa en el ratón contra ésta misma bacteria. (24)

-Lipopolisacárido y componentes asociados

El lipopolisacárido (LPS) de B.pertussis tiene varios rasgos que lo distinguen de las endotoxinas de otros organismos Gram negativos. Este compuesto por dos lípidos distintos, el lípido A y el lípido X, así como por dos diferentes cadenas de oligosacárido (tipo I y II) que contienen de doce a dieciséis unidades de monosacárido cada uno. Diversos investigadores han demostrado que B. pertussis tiene dos lipopolisacáridos inmunológicamente distintos. El lipopolisacárido intacto de B.pertussis tiene las propiedades atribuidas a las endotoxinas de otros microorganismos gram negativos, como son la pirogenicidad, hipersensibilidad a histamina (44), capacidad de causar shock y leucopenia seguida por leucocitosis y de proteger en forma no específica contra las infecciones (24). Los componentes fraccionados del lipopolisacárido tienen propieda

(11)

des fundamentales: La fracción lípido X presenta las actividades comunes de endotoxina, pero el lípido A tiene escasa capacidad de producir pirogenicidad ótoxicidad. Sin embargo, el lípido A tiene una gran actividad adyuvante y antiviral.

La fracción oligosacárido causa mitosis en linfocitos de ratón, es un activador policlonal de esplenocitos de conejo y estimula la secreción de interleucina-I en monocitos humanos. Otro componente de B. pertussis con actividad extraña es un lípido recientemente descrito, que contiene ornitina. La molécula intacta causa hemaglutinación, pero la eliminación de la porción de ácido hexadecanoico de este lípido resulta en la disminución de esta actividad. La forma modificada, sin embargo, es hemolítica. (44)

-Citotoxina traquesal

Este es un pequeño péptido descubierto y aislado por Goldman y col. (44) Su composición de aminoácidos indica que puede ser un derivado del peptidoglucan bacteriano, y es producida tanto por las cepas virulentas como avirulentas. Esta toxina es específicamente tóxica para las células ciliadas, aparentemente inhibe la síntesis de DNA, pero el mecanismo de acción molecular y las bases para esta especificidad de las células blanco es desconocida.

-Factor sensibilizante a la histamina (FSH)

Parfentjer y col. (17) establecieron que en los ratones previamente inyectados con vacuna pertussis o extractos de pertussis se presentaba un shock letal, debido a que se causaba una elevada sensibilidad a los efectos letales de la amina, en tanto que en la rata (normalmente resistente) se presentaba sólo una ligera sensibilización. (24)

Dentro de las cepas de ratón sensibles a la histamina, las hembras generalmente son más sensibles que el macho. La edad también puede ser un factor importante, lo mismo que la dieta del animal y la vía de administración emplea

da. (28)

El mecanismo de acción del FSH es incierto, pero parece estar relacionado con aberraciones en el metabolismo de la histamina, como son la depresión en los niveles de histaminasa o incremento en los niveles de histidina descarboxilasa. Algunas evidencias sugieren que el FSH es una lipoproteína de cerca de 90 000 D (16). La actividad de FSH se destruye por el calor, formalina y algunas enzimas proteolíticas, como la tripsina y una proteasa del Bacillus subtilis. La sensibilidad a la histamina es posterior al período de leucocitosis, por lo tanto, los fenómenos FSH y FPL son independientes entre sí. (25)

-Factor Promotor de Leucocitosis

Dos proteínas han recibido particular atención en la patogénesis e inmunidad de B. pertussis: el factor promotor de leucocitosis (FPL), y la hemaglutinina filamentososa (FHA), observándose que el FPL es claramente distinto del pili hemaglutinante de B. pertussis. (26)

El FPL, cuyos sinónimos son toxina pertussis, pertusígeno, proteína activadora de los islotes, toxina promotora de linfocitosis y factor sensibilizante de histamina, es una proteína globular oligomérica compuesta por un B-oligómero pentamérico involucrado en unir a la toxina con la membrana, y un A-oligómero que tiene una actividad de ADP-ribosil transferasa. (28)

El FPL aparece como estructuras filamentosas, ordenadas en forma circular cuando se observa bajo el microscopio electrónico (28). Es sensible a enzimas proteolíticas y no se afecta por el peryodato, lo que sugiere la ausencia de un grupo carbohidrato, esencial para la actividad biológica. Es insoluble en agua, reguladores isotónicos y requiere un pH alcalino mediante la adición de 0.5% de NaCl 1M o regulador urea para solubilizarlo. Algunos autores han encontrado que la preparación contiene aproximadamente un 50% de lípidos, sin embargo, se ha podido aislar FPL de B. pertussis fase I que no contenía lípidos.

(24)

Empleando la técnica de doble difusión en agar con suero anti-pertussis heteroespecífico ha podido determinarse que es un componente inmunológicamente reactivo. Contiene pocos o ningún lípido y aproximadamente 1% de carbohidratos con 14.5% de nitrógeno, lo que sugiere, que este factor es, de hecho una proteína. En el FPL purificado y tratado con dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol, y sujeto a electroforesis en gel poliacrilamida se han localizado 4 bandas de polipéptidos con peso molecular de 13,400, 17,400, 19,300 y 23,500 D determinándose entonces un peso molecular final de 73,600D, aunque hay evidencias de que los 4 polipéptidos no están en proporción equimolar, sino de que se encuentran dos moles del polipéptido mayor por cada uno de los tres, lo que indicaría un total de aproximadamente 87,000 D. (24)

La estabilidad en la actividad de FPL y FHA fue idéntica a diferentes pH. Cuando se determinó dicha actividad entre pH 2 y 11 se observó pérdida de la misma en FHA así como turbidez de la solución, lo que indica una agregación molecular. Al ajustar el pH la solución se vuelve clara nuevamente.

Por otra parte, la actividad no decrece al exponerse a temperaturas inferiores a 56°C, pero sí disminuye un 50% a 70°C y si se pierde entre los 80 - 100°C. (27)(39). Sin embargo, cabe indicar que algunos estudios demuestran que el calentamiento del sobrenadante a 56°C por 30 minutos causa pérdida del 50-75% de la actividad. (25)

La vía de inoculación tiene un efecto importante en los resultados. La vía intravenosa es la más efectiva y después la intraperitoneal; la vía subcutánea resultó inefectiva para producir leucocitosis. El mismo patrón de efectividad lo presenta la sensibilización a la histamina. (27)

B.pertussis en fase I produce los siguientes efectos: Letalidad y dermatonecrosis, causados por componentes lábiles al calor, fiebre, por la endotoxina-

lipopolisacárida de la pared celular de los organismos gram negativos; sensibilidad a los efectos letales de agentes farmacológicos de la histamina y serotonina, y efectos no específicos como la hipersensibilización al frío, rayos X e infecciones virales. (25) También se reportan shock endotóxico y shock peptona aumento de anafilaxis, inmunopotencialización en relación con el anticuerpo convencional, anticuerpo homocitotrópico e hipersensibilidad retardada, hipoglucemia y disminución de la respuesta hiperglicémica a la epinefrina, así como leucocitosis con predominio de linfocitos. Además, toda la célula y/o extractos crudos del organismo en fase I inducen inmunidad protectora contra pertussis, tanto en los animales como en el ser humano. (26)

El FPL es una de las toxinas principales de B.pertussis, es de carácter proteico y por sí mismo puede causar linfocitosis en ratones normales y en los "nude", inducir sensibilización a la histamina y aumentar la liberación de insulina con hipoglucemia, en tanto que retarda el efecto hiperglicémico de la epinefrina y funciona como un adyuvante inmunológico (26). Es, por lo tanto, el responsable de algunas manifestaciones sistémicas de la infección por B.pertussis, las cuales son bloqueadas por el antisuero monoespecífico contra FPL.

(22)

Uno de los signos cardinales de la actividad de pertussis es la linfocitosis que causa, reportada por primera vez por Fröhlich en 1897 (24). B.pertussis tiene un alto grado de ataque, el 90% de los individuos susceptibles expuestos serán infectados, y si no hay una intervención de antibióticos la infección podrá persistir por 3 a 8 semanas, lo que indica el efectivo mecanismo de resistencia de este organismo a las defensas naturales del huésped. (22)

La linfocitosis y leucocitosis son signos bien conocidos de la infección de B.pertussis en humanos y ratones, aunque no hay evidencia directa, se considera que dichos signos se presentan a causa de la liberación de FPL a partir -

del organismo durante su crecimiento en el tracto respiratorio. (22)

La linfocitosis ocurre en la mayoría de los pacientes de 6 meses de edad pero es menos frecuente en pacientes de más edad (24). La cuenta de leucocitos periféricos en niños puede llegar a ser mayor de $175,000 \text{ cel/mm}^3$, siendo estos en su mayoría linfocitos pequeños, maduros, de aparición normal. El FPL, sin embargo, no induce la maduración de células T precursoras de células T funcionales. (26)

Los polimorfonucleares (PMNs) también suelen elevarse por la acción de este factor, pero una elevación significativa en la cuenta de neutrófilos sugiere la presencia de una infección bacteriana secundaria. (24)

Tanto a la infección experimental como la aplicación de B. pertussis y sus productos han causado linfocitosis, la cual en algunos casos ha sido principalmente de granulocitosis y en otros casos de pequeños linfocitos. Dichos leucocitos alcanzan sus valores máximos entre los 3 y 5 días posteriores a la infección o inyección, y disminuyen después de las 2 a 3 semanas hasta valores normales. En su punto máximo la leucocitosis puede haber excedido las $200,000 \text{ cél/mm}^3$. La linfocitosis polimorfonuclear relativa es mayor que la leucocitosis cuando se presenta. (24)

Cuando se ha empleado materia cruda se ha visto entre las 6 y las 12 horas, un marcado incremento en los PMNs de vida corta, sin embargo, esta reacción puede deberse a otro componente, que podría ser una endotoxina, ya que este efecto no ocurre después de la administración de FPL purificado. (24)

Se han hecho muchos estudios acerca de FPL y su actividad, los cuales coinciden en su mayoría, el resultado de que FPL es el responsable de las actividades anteriormente citadas se apoya en el hecho de que se han utilizado preparaciones de FPL altamente purificadas que migran como una sola banda en una electroforesis en gel poliacrilamida. Las preparaciones contienen niveles vir-

tualmente indetectables de endotoxina y adenilato ciclasa extracitoplasmática de B. pertussis. Los efectos de FPL son los mismos tanto en ratones sensibles a la endotoxina como en los hiposensibles a la misma.

Cuando la preparación de FPL es tratada en condiciones que reduzcan el efecto promotor de leucocitosis, la preparación no inhibirá al AMP. (22)

La actividad de FPL fué estudiada a las 0,2,6,24,48 y 72 horas después de inocular a animales de experimentación, a las dos horas se observó leucopenia y a las seis horas una marcada leucocitosis. (25)

Al ser inyectada una cantidad tan pequeña como 0.02µg en forma intravenosa al ratón se pudo observar una leucocitosis significativa, con niveles de aproximadamente 150,000 cél/mm³. Dicha leucocitosis fué detectada alrededor de las 4-6 horas después de la administración de la vacuna, y alcanzó un máximo entre el 3o y 5o día, cerca del 7o. día los valores comenzaron a decrecer para llegar a los niveles normales entre la tercera y cuarta semanas. (26) (27)

En el momento de máxima respuesta, 3o a 5o. día los pequeños linfocitos se estimaron en un 50-70% de la población leucocitaria, siendo del 25-40% granulocitos y el resto linfocitos grandes y monocitos. Cualitativamente la respuesta es similar entre las diferentes cepas de ratones. (26)

Tanto los linfocitos B como los T sufren un marcado incremento, el incremento en la cuenta absoluta de PMNs, linfocitos y monocitos causada por el FPL sugiere que este actúa sobre todos los leucocitos, a través de un sitio o mecanismo similar. (22)

Ciertos estudios "in vitro" demuestran que el FPL inhibe en gran medida la migración de macrófagos, pero tiene poco o ningún efecto en la viabilidad, ataque, fagocitosis o producción de superóxidos. Otro investigadores han reportado que los PMNs en animales tratados con células de B. pertussis o extractos libres de células, migran pobremente a los sitios donde se localiza la infec -

ción, por lo tanto, el FPL es el responsable de la inhibición de la migración de PMNs a los sitios de inflamación. (22)

Hasta ahora el mecanismo de acción para la leucocitosis y la linfocitosis causadas por B.pertussis indica que el FPL es adsorbido en la superficie del linfocito causando disturbios en la migración normal del flujo de vasos linfáticos, por ejemplo, inhibiendo la migración de linfocitos através de vénulas postcapilares en los tejidos linfáticos, de aquí que la retención de linfocitos en los vasos sanguíneos pueda ser observada. (22) (39)

El mayor número de linfocitos circulantes parece venir del ducto torácico ya que el fluido linfático decrece grandemente después de la inyección de la vacuna; sin embargo, los linfocitos del timo, nódulos linfáticos y bazo pueden también ser detectados. Se produce una baja de peso en el timo, de un 35% al cuarto día, permaneciendo bajo, hasta los 14 días. También se reducen en los nódulos linfáticos mesentéricos un 57% al séptimo día, pero el 14 son otra vez normales. El bazo presenta un incremento de peso, permaneciendo elevado durante catorce días, pudiendo además desarrollarse linfomas en el ratón. (27) Esto indica que la linfocitosis no es debida a un incremento de células de nueva proliferación, sino más bien es consecuencia de una redistribución de células - en contraste, la respuesta de PMNs es debida en parte a ambos, redistribución y proliferación. (24)

Se ha demostrado que el paso de linfocitos circulantes va de la sangre a los tejidos linfáticos y luego a los nódulos linfáticos, para regresar nuevamente a la sangre después de pasar através del ducto torácico. (24). Esta recirculación se ve alterada en ratones tratados con pertussis, y en este caso los linfocitos no pueden abandonar la sangre ni los nódulos linfáticos, por lo que se presenta un decremento en el contenido celular de los nódulos linfoides y la pulpa blanca del bazo. El FPL ha demostrado la capacidad de combinarse en

forma reversible con la superficie de diferentes tipos de células, principalmente linfocitos, aunque no es claro aún si el sitio primario de acción es en los linfocitos o en las vénulas postcapilares, por lo que se requieren estudios más profundos sobre el mecanismo de acción de este factor, que juega un papel primordial en la patogénesis e inmunidad de B.pertussis. (24)

- El FPL como factor protector

La tosferina, como enfermedad, ha podido ser controlada en forma eficaz empleando las vacunas pertussis de células completas; sin embargo, aún se necesita una vacuna menos reactogénica que contenga los antígenos protectores necesarios. Pasos importantes hacia ello han sido el aislamiento e identificación de los componentes tóxicos y los antígenos potencialmente protectores de B.pertussis. (27). El FPL y FHA son antígenos protectores para humanos que se han usado en vacunas pertussis, el FPL o FHA inactivados protegen al ratón de la muerte posterior al desafío intracerebral o respiratorio. (28)

El desafío intracerebral es el método estandar para evaluar la potencia de las vacunas pertussis, y se correlaciona con la capacidad de las vacunas para proteger al ser humano; sin embargo, la interacción huesped-parásito empleado el modelo de cerebro de ratón puede no ser paralela a la que se da en la enfermedad respiratoria humana. En tal caso el modelo de infección respiratoria en ratón tiene mayor similitud con la enfermedad humana y es considerado un mejor modelo para el estudio de pertussis. (28)

El FPL fué identificado como un antígeno protector cuando se utilizó para la inmunización activa contra la muerte causada por el desafío intracerebral, así como para la inmunización activa o pasiva contra la enfermedad, causada por el desafío respiratorio.

El FHA, en cambio, no protegió al ratón del desafío intracerebral, y fué identificado como antígeno protector del ratón únicamente por medio de la inmu-

nización activa seguida del desafío respiratorio. (27) (28)

Los ratones infectados con aerosoles de B.pertussis fueron protegidos pasivamente contra la enfermedad por dos preparaciones de anticuerpos: anti-FPL-FHA y anti-FHA. Lo anterior corrobora la antigenicidad identificada en FHA como una preparación antigénica, y sugiere que la inmunización con FPL-FHA podría proteger al ratón de la infección. EL FPL-FHA es letal a bajas concentraciones, lo que se demuestra por la prueba de potencia, encontrándose que la dosis letal es menor que la protectora. (41)

Se ha demostrado que las vacunas pertussis que ocasionan alto grado de sensibilización a la histamina son generalmente más protectoras contra la infección intracerebral que las vacunas destoxificadas. La dosis sensibilizante de una vacuna tóxica resulta ocho veces mayor que la de la misma vacuna cuando es destoxificada por medio de un corto período de calentamiento a 56°C. (34)

En suma, aunque el mecanismo de protección aún necesita aclararse, FHA y FPL han sido identificados como antígenos protectores de ratón, antígenos potencialmente protectores para humanos y candidatos para una nueva vacuna activa en el desafío respiratorio de ratón, que es un modelo más útil que el modelo empleado para identificar los antígenos potencialmente protectores. El modelo de infección respiratorio puede ser útil para demostrar la actividad de proteínas adicionales purificadas de B.pertussis como antígenos potencialmente protectores. (28)

- Toxina pertussis

La toxina pertussis es el producto más extensamente estudiado de B.pertussis y es indudablemente el principal factor de virulencia(44). La toxina pertussis afecta la función de las células blanco por catalización de la transferencia de ADP-ribosa de NAD a la subunidad alfa de uno o más nucleótidos de guanina unido a proteínas. Es importante hacer notar que la toxina pertussis -

no es citolítica pero altera un poco la respuesta celular por moléculas reguladoras.

La toxina pertussis ha sido previamente conocida por varios nombres, muchos de ellos referidos a las consecuencias biológicas de esta acción in vivo: factor sensibilizante a la histamina (FSH), factor promotor de leucocitosis (FPL), protefina activadora de los islotes y pertussígeno.

FACTORES DE VIRULENCIA DE B.pertussis

Desde hace tiempo ha habido interés por estudiar el aislamiento y caracterización de los factores bacterianos responsables de la enfermedad producida por B.pertussis así como los mecanismos involucrados.

Numerosos componentes de B.pertussis justifican la consideración como posibles determinantes de virulencia y aunque hay diferentes clasificaciones de los factores de virulencia de B. pertussis y algunas son basadas en la actividad biológica que manifiestan, otras desde el punto de vista bioquímico o su relación con las fases de la enfermedad producida por el microorganismo. La clasificación más reciente encontrada es la que reportan Weiss y Hewlett (44) en 1986 y que se muestra en la tabla I. Esta clasificación incluye factores tales como los aglutinógenos, la hemaglutinina filamentososa, la hemolisina, el lipopolisacárido, la citotoxina traqueal, la toxina adenilato ciclasa, la toxina dermonecrótica, así como la toxina pertussis.

TABLA 1

FACTORES DE VIRULENCIA DE B. pertussis (44)

NOMBRE	ESTADO DE INFECCION	PROPIEDADES (Masa Kd molecular)	BIOQUIMICAS (Subunidades Kd)	MECANISMO DE ACCION
Aglutinógenos				
FS 2*	A	22.0	---	Desconocido
FS 6*	A	21,5	---	"
Toxina adenilato ciclasa	D,L,S	Enzima 70 Toxina 190	Desconocido Desconocido	Cataliza producto de AMPc en células - blanco.
Toxina dermonecrótica	L,S	102.0	24.30	Inhibición de Na ⁺ -K ⁺ ATPasa
Hemaglutinina Filamnetosa	A	200.0 130.0 100.0	Desconocido	Desconocido
Hemolisina	L	Desconocido	Desconocido	Desconocido
Lipopolisacárido	L,S	---	---	Desconocido
Toxina Pertussis	A,D,L,S	117.0	28,23,31,14 11	Ribosilación-ADP de nucleótido de guanina unido a proteínas
Cito-toxina - trqueal	D,L	1.8	Desconocido	Inhibición de síntesis de células ciliadas

1: A. Adherencia D. Evasión de la respuesta inmune L. Daño local L. Infección - Sistémica *FS: Serotipo de la fimbria.

INTERACCION HUESPED-PARASITO

La adherencia específica de B.pertussis a los cilios ha sido demostrada en muchos animales. Se dice que las fimbrias participan en la adherencia a las células blanco, pero esto no ha sido demostrado totalmente. Muchos estudios muestran, que la hemaglutinina filamentosa, puede ser importante en la adherencia - ya que mutantes deficientes de FHA (hemaglutinina filamentosa) o de toxina pertussis no se adhieren a los cilios, lo que sugiere que puede haber un receptor - específico en los cilios para estas sustancias. (44)

Diversos estudios muestran como B.pertussis evade la respuesta del huésped pudiendo por acción de la adenilato ciclasa inhibir la quimiotaxis, fagocitosis generación de superóxidos, muerte microbiana por leucocitos polimorfonuclear, - así como también pueden inhibir algunas acciones específicas como serían inhibición de la actividad oxidativa de macrófagos alveolares, actividad oxidativa y muerte bacteriana por monocitos, lisis de células blanco por células NK y crecimiento de células leucémicas promielocíticas. (44)

Otro componente de B.pertussis que tiene profundos efectos en la inmunidad es la toxina pertussis. Diversos estudios han demostrado que esta toxina inhibe la migración de monocitos tanto "in vivo" como "in vitro", así como la respuesta oxidativa y las enzimas lisosómicas relacionadas con la fagocitosis.

El proceso de desgranulación que depende del fosfatidil inositol, la hidrólisis y la movilización de calcio, es bloqueado también por la toxina así como el efecto citolítico de linfocitos NK.

Una acción sinérgica entre la adenilato ciclasa y la toxina pertussis puede ser la causa de la inhibición de la respuesta celular inmune en el sitio de la infección. (44)

Datos recientes indican que la actividad de la endotoxina y la citotoxina-traqueal tiene efectos profundos en el sistema inmune. En la infección local, -

hay daño tanto a cilio como a células ciliadas y después de algunos días las células mueren y hay necrosis. Se conoce que la citotoxina traqueal, causa citólisis y cambios patogénicos en células epiteliales, por otro lado, se conoce la ausencia de cambios locales significativos producidos por la toxina dermonecrótica, la toxina pertussis y la adenilato ciclasa.

En cuanto a la enfermedad sistémica se conoce como una de las más graves - la leucocitosis con predominancia de linfocitos, así como trastornos en el metabolismo de la glucosa y algunas complicaciones que revelan encefalopatía.

Algunos estudios indican que es probable la participación de IgG a este nivel pero no se tienen las bases suficientes para afirmarlo, dado los efectos de la infección. (44)

RESPUESTA A LA TERAPIA CON SUERO Y ANTIBIOTICOS

El antisuero y algunos antibióticos de amplio espectro son agentes antibacterianos efectivos contra B.pertussis si se aplican en la primera, o comienzos de la segunda etapa, contrarrestando o modificando el curso de la infección.

Algunos tratamientos muestran que con la aureomicina que se comienza a dar con tratamiento de los dos a los diez días de la aparición de la tos paroxismal se reduce la duración y severidad de la enfermedad más no se elimina el problema. (32)

MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO DE LA INFECCION EXPERIMENTAL

El ratón ha sido el animal en el que se ha demostrado la actividad biológica de B.pertussis, usando la vía intracerebral e intranasal (aunque también - han servido como modelo los conejos, gallinas, monos y ratas).

Cuando se inyecta al ratón por vía intracerebral con la cepa 18323 la bacteria se multiplica progresivamente en la pared del ventrículo, íntimamente asociado con los cilios, observándose que el ratón muere a los diez días no habien

do invasión de la bacteria en la substancia celular. Esta localización es similar a la de la bacteria entre los bronquios y los cilios traqueales en la infección en humanos (44). La protección en contra de una inoculación por vía intracerebral es un estándar para medir la potencia de una vacuna pertussis.

(36)

Cuando la inoculación es por vía intranasal, o por medio de aerosoles, se producen en el animal manifestaciones de la acción de la toxina pertussis en el humano como son: linfocitosis, hipoglucemia e hiperinsulinemia. Así mismo - al igual que los humanos adultos no mueren por la infección, los ratones mayores no lo hacen, no obstante los ratones pequeños como los humanos menores mueren significativamente. (44)

B.pertussis no es un patógeno natural para animales, de ahí que se hayan hecho diversos estudios sobre otro modelo animal y se haya llegado finalmente a la conclusión de que el ratón es el más fácil de manejar y presenta mucha similitud en cuanto a la enfermedad producida en el hombre y en cuanto a la reacción que tiene este animal a la vacuna que se utiliza para inmunización en niños.

Diversos autores muestran que los ratones al recobrase de la enfermedad y de la infección pulmonar fueron inmunes a la reinfección.

Posterior a la inoculación intracerebral, se observa en las glándulas adrenales una marcada depleción lipídica que comienza a los cinco días existiendo un incremento de deshidrogenasa succínica, estereasas no específicas y fosfatasa ácida. Hay cambios terminales en cuanto al hígado, y los folículos linfoides del bazo se atrofian. (32) (36)

En ratones inmunizados, B.pertussis, se multiplica en el cerebro hasta ni veles de 10^3 a 10^6 bacterias/ml en cuatro a seis días desapareciendo rápidamente. Esta desaparición está asociada a un incremento en la permeabilidad de las

barreras cerebrales, pudiéndose demostrar por medio de anticuerpos fluorescentes contra B. pertussis. (32)

De aquí la importancia del estudio de los factores de virulencia de B. pertussis, y sus efectos tanto en modelos animales, como el ratón y su aplicación en la preparación de la vacuna para humanos.

LA VACUNA CONTRA LA TOSFERINA

Dado que la tosferina se consideraba anteriormente como una seria epidemia respiratoria que afectaba principalmente a infantes, y desde sus primeros focos epidémicos en Europa en el siglo XVI, causando graves muertes, se comen- zaron a hacer estudios para la creación de una vacuna efectiva y segura, y claro está que la composición de ésta, cambió con el paso del tiempo.

Hoy en día, después de la inmunización, la prolongación y severidad de la tosferina se ha atenuado, aunque ocasionalmente surgen secuelas que incluyen - el daño al sistema nervioso, seguido de anoxia y hemorragia cerebral causada - por una elevación en la presión venosa durante los episodios de tos paroxismal conociendo que los infantes de menos de 6 meses de edad, y niños nacidos prema- turamente o con desórdenes congénitos son especialmente vulnerables, a estas- complicaciones. (23)

La tosferina era una de las enfermedades que más muertes causaba, pero para el siglo XX el número ha descendido enormemente; sólo se reportan casos esporádicos, tales como una epidemia de 102,500 casos en Gran Bretaña, en el último cuarto de 1977 y hasta la mitad de 1979, reportándose un total de 36 muertes, donde a sólo la mitad de los pacientes se les confirmaba tosferina por - aislamiento de B. pertussis.

Composición: La mayoría de las vacunas pertussis que se usan actualmente son - de células completas inactivadas por calor que son biológicamente muy comple - jas, la mayoría están combinadas con los toxoides diftérico y tetánico aumen -

tando la antigenicidad de éstos, usando adyuvantes como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio. Las vacunas contienen una serie de componentes con cierta actividad como son: aglutinógenos, adenilato ciclasa, endotoxina, hemaglutinina filamentosa, toxina lábil al calor, factor promotor de leucocitosis y citotoxina traqueal.

Efectividad de la vacuna: Los resultados de diversos estudios indican que las vacunas recientemente usadas son efectivas, pese a la epidemia de 1977-1979, en Gran Bretaña. Diversos análisis con respecto a la edad reportan que niños vacunados menores de 5 años dan mejor respuesta que los vacunados posterior a esta edad. Se ha concluído que la vacuna pertussis en uso provee niveles satisfactorios de protección en contra de la enfermedad y reduce la severidad de ésta en individuos infectados, recomendándose aplicar la vacuna en tres dosis espaciadas en el primer año de vida comenzando preferiblemente en el tercer mes.

La vacuna contra la tosferina ha contribuído a la reducción de la incidencia y severidad de la tosferina desde 1950.

La epidemia de 1977-1979 en Gran Bretaña se atribuye a causas socio-económicas, y es conveniente mencionar que en ese país aún se recomienda el uso de la vacuna, como curso a seguir en la inmunización de un niño (23). Sin embargo en otros lugares como Alemania, Japón, Suecia y Austria se han observado diversos casos de encefalopatía después de la aplicación de la vacuna pertussis y esto ha sido causa suficiente para retirarla del mercado, lo cual ha traído como consecuencia la motivación para desarrollar otra vacuna pertussis aceluar, que actualmente se emplea en Japón para la inmunización.

Seguridad de la vacuna: La vacuna pertussis contiene muchas sustancias biológicamente activas que tienen un efecto inmunológico farmacológico y toxicológico y no es extraño que en algunos individuos cause una reacción no deseable, algunas veces con consecuencias serias. La naturaleza y frecuencia de las reac

ciones indeseables han sido cuidadosamente determinadas e identificadas, además de que se han determinado los grupos más susceptibles para establecer en ellos la inmunización más adecuada. Con el fin de determinar la inocuidad de las vacunas, se llevan a cabo investigaciones y experimentos en forma continua en la mayoría de los países. (12) (23)

PRODUCCION DE LA VACUNA PERTUSSIS

Tan importante como el estudio de los efectos de la vacuna pertussis después de su administración, es el estudio y análisis de la producción de la vacuna; dicho análisis comprende la cepa de B.pertussis a emplear, el medio de cultivo donde se desarrollará y el crecimiento de la bacteria, entre otras etapas igualmente importantes.

En el Instituto Nacional de Higiene (INH), de la Gerencia General de Biológicos y Reactivos, dependiente de la Secretaría de Salud, donde usualmente se lleva a cabo la producción de la vacuna pertussis, así como el control de calidad a lo largo de la misma. En el esquema I se muestra, de manera general como se realiza la producción de la vacuna.

Aún cuando ya se ha establecido el método de producción, se continúan haciendo investigaciones con el fin de mejorar tanto la evaluación como cada paso del mismo.

En cuanto al medio de cultivo, Hornibrook (1939), fué el primero en descubrir la utilidad del medio líquido en la propagación de B.pertussis en fase I, y desde entonces se han publicado muchas modificaciones de su formulación original, en la cual el medio líquido incluía un hidrolizado de caseína adicional de varias sales, factores de crecimiento y resinas aniónicas o carbón. Por su parte, Stainer y col. (43), en 1970 propusieron un medio que contiene sodio glutamato, prolina, cistina, sales y factores de crecimiento propios para la producción a gran escala de la fase I de B.pertussis. Más de 30×10^9 organis-

ESQUEMA 1

ETAPAS DE PRODUCCION DE LA VACUNA PERTUSSIS
(INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE)

Ampula con la cepa de B. pertussis
(siembra en Bordet Gengou)

resiembras en B.G.

Lote semilla

Fermentador

Cosechar a un pH de 7.2-7.4

Inactivar apquete celular, adic
ción de ácido cítrico, ajuste
de pH a 3.8-3.9

Refrigeración en cámara fría
para permitir la separación-
de paquete celular.

Reunión de paquete celular y
ajuste de pH de 6.8-6.9

Destoxificación

Muestreo para enviar a con -
trol de calidad

Entregar como producto a gra
nel.

mos/ml fueron producidos en 48 a 72 horas de crecimiento.

Por otro lado, la introducción de técnicas de fermentación continua, dentro de la producción es un hecho de gran importancia en nuestros días. La fermentación en la que se logra una estabilidad por adición de medio fresco y remoción de igual cantidad del ya utilizado, así como el control del pH del cultivo proporcionan grandes perspectivas en la producción de vacunas pertussis sobre la base de la actividad protectora. (16)

Así mismo los fermentadores que se utilizan en la producción son importantes porque también de ellos puede depender el buen o mal crecimiento de la bacteria, a este respecto Cameron P. y col. (7) describen el uso de fermentadores de acero inoxidable cuya ventaja es la durabilidad; experimentando con diferentes tipos de acero y diferentes cepas, en el mejor de los casos se obtuvo una buena producción de E.pertussis y las vacunas hechas con estos cultivos reunieron todos los requerimientos de potencial y seguridad.

CONTROL DE CALIDAD DE LA VACUNA PERTUSSIS

Las pruebas de control de una vacuna son complejas debido a los serios problemas éticos, legales y logísticos, para justificar la inyección en niños.

Las vacunas de manera primaria deben presentar pruebas a nivel químico y biológico así como un control estricto a lo largo de todo el proceso de producción.

Como ya se mencionó, en el Instituto Nacional de Higiene, se lleva a cabo la producción de la vacuna pertussis y su control de calidad. Se realiza un control del proceso, un control químico y un control biológico en todas las etapas de producción.

En el departamento de control biológico se llevan a cabo diversas pruebas acordadas a las disposiciones establecidas por la Organización Mundial de la Salud, (29), como son la prueba de potencia, de toxicidad y de esterilidad, prin

cialmente. Uno de los puntos más importantes en el estudio de la vacuna es la determinación del número de microorganismos por mililitro, para lo cual se emplean estándares de opacidad. Estos estándares corresponden a diez unidades de opacidad (UOP) los cuales se asemejan a una suspensión de B. pertussis que contiene 80×10^6 microorganismos/0.03 ml (INH). Ya que las vacunas deben contener como máximo 20×10^9 microorganismos por dosis, son estandarizadas ajustando su opacidad; para su aplicación se recomienda una dosis de 1ml en una dilución 1:2 de esta vacuna (6). Si bien el conteo celular por unidades de opacidad viene a limitar otro tipo de elementos importantes, como el tamaño y forma celular, es un elemento práctico de medición que asegura uniformidad entre laboratorios sin requerir equipo especial.

Se aplica la prueba de potencia a cada lote de producto a granel, y a cada lote de producto final. En ella se compara la actividad de la vacuna con estándares internacionales para pertussis o con un estandar equivalente, derivado de éste, y aprobado por la OMS. Es decir, la potencia se mide comparando la respuesta de grupos de ratones inmunizados con diluciones seriadas de la vacuna a probar, así como grupos de ratones inmunizados con la dilución correspondiente de una vacuna de referencia. Si otros parámetros, como homogeneidad de respuesta, paralelismo en las curvas de respuesta, letalidad y niveles de desafío, son satisfactorios, se asigna un valor numérico en unidades protectoras - en ratón. Para esta prueba se utilizan 350 a 400 ratones del mismo sexo y con un peso de 14 a 16 gramos; de las cuatro semanas que dura la prueba, dos son para inmunización y las otras dos para observación post-desafío, el cual es por vía intracerebral. La cepa de B. pertussis empleada en el desafío es la 18323. (6)

La toxicidad de la vacuna se determina en la prueba de toxicidad en ratón o ganancia peso-ratón. Los ratones de 15 g son inyectados con la mitad de una dosis de vacuna para humano; algunas veces pierden peso en las primeras 24 -

horas post-inoculación, pero si lo recuperan se considerará que la vacuna es a tóxica; de esta forma, sólo resulta una vacuna atóxica si al final de la prueba, que es a los siete días después de la inoculación, hay ganancias de peso - con respecto a un grupo de ratones controles que han sido inoculados sólo con el diluyente y no con la vacuna. (6)

La cepa de ratones es también un factor importante ya que algunos no son sensibles a la vacuna.

Existe otro tipo de prueba para medir la toxicidad, el cual está basado - en las reacciones locales que produce la administración de la vacuna. Se ha em pleado la variación en el tamaño del edema producido en la pata de la rata des pués de la inoculación, para medir reacciones locales e hipersensibilidad a la vacuna pertussis. Dicha reacción es valorada midiendo la pata afectada con un calibrador y comparándola con la pata opuesta del mismo animal, o bien midiendo el desplazamiento de agua o mercurio con un manómetro, o por incisión en la piel de la pata y midiendo el agua tisular. Manclarck y col. (21) en 1977 em plearon otro método, que consistió en inyectar las diferentes muestras de vacu nas a los animales en diferentes tiempos, sacrificándolos después y cortando - los miembros inferiores para pesarlos; la diferencia de peso entre las dos patas fue tomada como medida del edema.

Así pues, una prueba de control debe ser reproducible y debe correlacionar con experiencias clínicas; tales pruebas deben ser directas, específicas y no requerir extrapolación.

Uno de los principales objetivos del presente estudio es precisamente el desarrollo de una prueba de toxicidad basada en el componente de B.pertussis - que desarrolla una actividad biológica específica, y que se denomina factor - promotor de leucocitosis (FPL).

(32)

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Estudiar la reducción de la toxicidad como una actividad biológica de una vacuna pertussis celular.
- Estudiar la relación entre la prueba de toxicidad (OMS) y la actividad del factor promotor de leucocitosis.
- Estudiar el efecto de la concentración de células sobre la toxicidad.
- Estudiar la cinética de la producción del factor promotor de leucocitosis de Bordetella pertussis.
- Estudiar el efecto de agentes químicos sobre la destoxificación de la vacuna pertussis.

METODOLOGIA

METODOLOGIA

Por ser de particular interés en la elaboración de las vacunas anti-tosferina, es necesario llevar a cabo una investigación acerca de la toxina pertussis, así como las diferentes características de virulencia de la misma. En el presente estudio se aplicó atención especial a cuatro aspectos de la toxina: La relación que guarda el factor promotor de leucocitosis con respecto a la toxicidad, las variaciones de dicho factor con respecto a la concentración celular - una evaluación del factor promotor de leucocitosis durante el proceso de producción de la vacuna pertussis y el efecto de algunos agentes químicos para des - toxificar la vacuna pertussis. A continuación se describen estos aspectos:

A.- RELACION ENTRE EL FACTOR PROMOTOR DE LEUCOCITOSIS Y LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD.

A.1. Muestras

Se tomaron al azar 57 muestras de vacuna pertussis al término de la producción. Cada una de ellas contenía la combinación de dos cepas clasificadas con los números 134 y 509. Cada muestra fue ajustada a 13 unidades de opacidad(UOP) para cada prueba.

Como algunas de las muestras evaluadas correspondían a iguales lotes, se llevó a cabo una agrupación de datos de la siguiente forma:

- a) Muestras que correspondían a iguales lotes pero que fueron divididos en diferentes garrafones, las cuales se incluyeron en los grupos numerados del 1 al 11.
- b) Muestras que correspondían a iguales lotes pero que tuvieron un tratamiento térmico diferente , el cual fue desde un calentamiento hasta tres,

Los datos fueron ordenados en forma decreciente de acuerdo al por ciento de

ganancia de peso para la prueba de toxicidad, con sus correspondientes valores de la cuenta leucocitaria, y se separaron en dos grupos: los tóxicos que tuvieron una ganancia de peso menor al 60% y más de dos muertes; y los atóxicos que cumplían con todas las características para serlo.

A.2. Análisis

Se llevó a cabo en cada muestra una evaluación rutinaria de toxicidad, así como una evaluación del factor promotor de leucocitosis, de la siguiente forma:

A.2.1. Prueba de toxicidad

Se usaron ratones albinos de la cepa NIH con un peso de 14 a 16 gramos. Para cada muestra se destinaron 20 de estos ratones, los cuales fueron pesados e inoculados con 0.5ml de la preparación, por vía intraperitoneal, para cada ratón.

Además se utilizó un grupo de ratones testigos, el cual consistió de sólo 10 ratones, que también fue pesado e inoculado, pero en este caso se inyectó 0.5ml de diluyente por vía intraperitoneal.

Se llevó a cabo un seguimiento por siete días de estos grupos, registrando las variaciones en peso y su estado físico general, así como la muerte de algún animal en el caso de que esto ocurriera. Al finalizar la prueba, se determinó la ganancia de peso de cada grupo, y se anotó como porcentaje, tomando en cuenta que el peso ganado por el grupo testigo o control correspondía al 100%. Esto es se pudo hacer una valoración de la toxicidad de cada vacuna determinando la variación de peso en los ratones, ya que una vacuna tóxica causa debilidad y como consecuencia pérdida de peso.

El criterio para determinar si una muestra es o no tóxica se define como sigue: una vacuna será tóxica si causa más del 5% de muertes (2 o más ratones) y si la ganancia de peso en porcentaje es menor al 60% una vez que la prueba ha finalizado.

A.2.2. Actividad del Factor promotor de leucocitosis

Se usaron ratones albinos de la cepa INH con peso de 14 a 16 gramos, destinando 5 ratones para cada lote a probar. Dichos ratones fueron sangrados cortando la punta de la cola para obtener la sangre de la vena caudal. El sangrado efectuado al día 0, sirvió para determinar los valores normales que se emplearon como límites en las siguientes evaluaciones de la toxina pertussis. Una vez determinados los valores iniciales se procedió a la inoculación de 0.5 ml de muestra por vía intraperitoneal. Posteriormente se tomaron lecturas de los leucocitos totales por milímetro cúbico, utilizando el hematócmetro, a los 3, 5 y 7 días posteriores a la inoculación.

B.- EFECTO DE LA CONCENTRACION CELULAR EN LA ACTIVIDAD DE FPL.

B.1. Muestras

Se trabajaron 10 muestras obtenidas al final de la fermentación, con un pH ajustado a 7.2 - 7.4 y con calentamiento a 56°C por 25 minutos. Las muestras fueron:

- 4 muestras de la cepa 509
- 3 muestras de la cepa 134
- 3 muestras de la cepa 165

Se realizaron diluciones de cada una de las muestras, para obtener las unidades de opacidad de 5 a 13, con un total de nueve diluciones por cada una de las muestras.

B.2. Análisis

B.2.1. Unidades de Opacidad

Se determinaron estas unidades (UOP) para cada una de las muestras, con el fin de conocer el contenido microbiano de ellas; realizando una serie de diluciones de la muestra original hasta llegar a igualar la opacidad con el estándar que equivale a 10 UOP.

B.2.2. Actividad del factor promotor de leucocitosis

Se llevó a cabo la cuenta leucocitaria en los días 0,3,5 y 7 posteriores a la inoculación de 0.5 ml de cada dilución a cinco ratones por vía intraperitoneal (véase metodología en A.2.2)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

C.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR PROMOTOR DE LEUCOCITOSIS DURANTE LA-
PRODUCCION DE LA VACUNA PERTUSSIS

C.1. Obtención de las muestras

Para el estudio se contaron con las siguientes muestras:

- 3 lotes producidos con la cepa 134
- 5 lotes producidos con la cepa 165
- 5 lotes producidos con la cepa 509

Las muestras de vacuna de la cepa 134 se tomaron cada cuatro o cinco ho -
ras durante el proceso de producción, la 509 y la 165 se muestrearon cada 5 ho
ras.

cada una de ellas fue etiquetada para su identificación, indicando el -
tiempo de proceso en que se tomó la muestra.

C.2. Destoxificación de las muestras

Inicialmente no se consideró la destoxificación de las muestras, pero al-
efectuarse la prueba del FPL, los cultivos mostraban actividad de toxina dermo
necrótica (TDN) y FPL, que ocasionaba la muerte de los animales, por ello se -
decidió efectuar la destoxificación que consistió en: hacer un calentamiento a
56°C durante 25 minutos, a cada una de las muestras de cada lote que se estu -
dió.

C.3. Análisis

Los cultivos destoxificados fueron probados para conocer su actividad de -
TDN y FPL.

C.3.1. Actividad de toxina dermonecrotica

Las muestras fueron inculadas a 2 ratones lactantes de la cepa INH de -
uno a tres días de nacidos, inyectando 0.1 ml en el lomo de los animales por-
vía subcutánea. El período de observación fue de 24 horas. La prueba positiva

de actividad de TDN fue aquella en la que el ratón mostro una reacción dermonecrótica en el sitio de la inoculación y la prueba negativa no mostro ésta.

C.3.2. Actividad del Factor promotor de leucocitosis

Esta prueba se efectuó como se indica en el punto A.2.2. realizando las lecturas a los tiempos de 0, 3, 5 y 7 días. Para el análisis de los datos sólo se consideró el quinto día, ya que por experiencias anteriores se conoce que la mayor leucocitosis se presenta generalmente al quinto día después de la inoculación.

D. EFECTO DE AGENTES QUIMICOS SOBRE LA DETOXIFICACION DE LA VACUNA PERTUSSIS

Uno de los problemas principales en la producción de la vacuna pertussis - es precisamente la detoxificación unida a la potencia de la misma. En esta parte se trató de encontrar un método químico mediante el cual se pudiera disminuir la toxicidad del producto en comparación con el método físico que actualmente se utiliza con este fin.

D.1. Muestras

Se trabajó una muestra (D-1) dividida en diferentes matraces, conteniendo 250 ml de producto debidamente etiquetados con la substancia o temperatura - con la que fue tratada.

D.2. Tratamiento de la muestra

Cada muestra contenida en los matraces fue tratada con cada uno de los agentes químicos y físicos de la siguiente manera:

D.2:1. Agentes químicos

- a) Glutaraldehído al 0.25% y 0.5%: Las muestras tratadas con este agente a cada una de las concentraciones, se detoxificaron durante hora y media, - eliminándose el glutaraldehído un vez concluido el tratamiento, con una dialisis contra agua destilada en una cámara fría (+2 a +8 °C) durante - 24 horas.
- b) Acetona al 5%: La muestra se detoxificó durante 18 horas, cambiandose la acetona cada 6 horas, el agente fue eliminado por evaporación.
- c) Beta-propiolactona a una concentración de 1:4000 : La muestra se detoxificó por tres horas y el agente no fue eliminado debido a que se transforma en productos que no afectan este análisis.

La concentración indicada para cada caso se refiere a una concentración - final del agente químico en cada muestra.

D.2.2. Tratamiento térmico

La muestra fue calentada a 56°C por 30 minutos, método comúnmente utilizado para la detoxificación de esta vacuna.

D.3. Análisis

Para probar la efectividad de estos métodos, a las muestras tratadas en D.2. se les realizaron las siguientes pruebas:

D.3.1. Prueba de toxicidad descrita en A.2.1.

D.3.2. Factor promotor de leucocitosis, descrito en A.2.2.

D.3.3. Toxina dermonecrótica, descrita en C.3.1.

D.3.4. Factor sensibilizante a la histamina (FSH)

Se utilizaron ratones hembras de 14-16 gramos de peso en grupos de 5 para cada muestra tratada.

La solución de histamina empleada fue una preparación de un gramo de difosfato de histamina disuelta en 100 ml de agua destilada. El diluyente fue una solución de cloruro de sodio al 0.85%.

Cada ratón se inyectó intraperitonealmente con 0.5 ml de cada muestra experimental diluida apropiadamente con solución salina. Se evaluaron paralelamente un testigo negativo que consistía únicamente en solución salina, y un testigo positivo empleando para tal caso Bordetella pertussis virulenta. La preparación experimental estaba libre de toxina dermonecrótica.

Al quinto día después de la inoculación, se pesó a cada ratón y se desafió con 0.01 ml de solución de difosfato de histamina por gramo de peso, por vía intraperitoneal.

Se registraron las muertes entre las 2 y 24 horas después del desafío con histamina y se calculó el porcentaje de mortalidad. Una muestra no tiene actividad sensibilizante a la histamina si no se presentan muertes después del desafío.

RESULTADOS

RESULTADOS

A. - RELACION ENTRE EL FACTOR PROMOTOR DE LEUCOCITOSIS Y LA PRUEBA DE TOXICIDAD

Con el objeto de conocer un parámetro más adecuado para evaluar los efectos tóxicos de la vacuna pertussis, además de la prueba de toxicidad que actualmente se emplea, se compararon los resultados obtenidos de 57 muestras de vacuna pertussis tanto en las pruebas de toxicidad como en el factor promotor de leucocitosis.

Estos resultados se analizaron y agruparon inicialmente en dos grupos. Las tablas 1 y 2- muestran estos datos. El criterio para separarlas fue el empleado para clasificar a una muestra como tóxica u atóxica, el cual define una muestra atóxica como aquella que provoca en el ratón una ganancia de peso mayor al 60% con respecto al grupo control y además no tiene más del 5% de mortalidad.

Como puede observarse en la tabla I el grupo que contiene la suspensión celular sin destoxificar, tiene valores de leucocitos entre 20,000 y 77,000 leucocitos/mm³ en el ratón. Dentro de éstos las muertes A-7, A-10 y A-11 analizadas al quinto día mostraron valores superiores a 70,000 Leuc/mm³, disminuyendo grandemente al séptimo día.

El grupo tóxico (Tabla 2), presentó mayores diferencias (entre 27,000 y 107,000 leucocitos/mm³) entre la toxicidad y la leucocitosis, como lo muestra A-15 en la cual la ganancia de peso es muy grande, hay poca leucocitosis pero hay dos muertes, o la muestra A-32, en la cual la leucocitosis es muy baja, pero la ganancia de peso no sobrepasa el 40% ni se presentaron muertes.

Estos dos grupos correspondieron a muestras que fueron analizadas individualmente; sin embargo, muchas de ellas correspondían a iguales lotes ya sea por haberse fraccionado la muestra original en varios garrafones, o bien por haber dado diferente tratamiento térmico para la destoxificación. Por ello, se di

Tabla 1. Relación entre Toxicidad y Leucocitosis para el Grupo I
(no tóxico)

Lote	Peso ganado	No. muertos	Resultado	Número de leucocitos $\times 10^3$ al día:			
				0	3	5	7
A-1	127.0	0/20	conforme	11.0	14.0	22.0	19.0
A-2	116.9	0/20	conforme	12.0	10.0	20.0	16.0
A-3	112.9	0/20	conforme	11.0	11.0	19.0	13.0
A-4	101.6	1/20	conforme	10.0	14.0	22.0	19.0
A-5	85.0	0/20	conforme	13.0	61.0	56.0	51.0
A-6	84.0	1/20	conforme	9.0	18.0	39.0	31.0
A-7	80.0	0/20	conforme	17.0	52.0	72.0	42.0
A-8	76.0	0/20	conforme	12.0	28.0	27.0	28.0
A-9	72.7	0/20	conforme	8.0	25.0	32.0	18.0
A-10	65.5	0/20	conforme	10.0	41.0	77.0	32.0
A-11	61.3	0/20	conforme	16.0	30.0	70.0	30.0
A-12	61.3	0/20	conforme	10.0	48.0	54.0	45.0
A-13	60.8	0/20	conforme	10.0	46.0	46.0	41.0
A-14	58.0	0/20	conforme	17.0	30.0	70.0	30.0

Tabla 2 Relación de Toxicidad y Leucocitosis para el grupo 2 (tóxico)

No.	Ide peso ganado	No. de muertes.	Resultado	Número de Leucocitos $\times 10^3/\text{mm}^3$ al día			
				0	3	5	7
A-15	128.5	2/20	tóxico	8.0	44.0	33.0	32.0
A-16	66.0	2/20	tóxico	9.0	21.0	27.0	25.0
A-17	57.4	2/20	tóxico	11.0	47.0	49.0	34.0
A-18	55.4	2/20	tóxico	11.0	42.0	66.0	37.0
A-19	55.0	9/20	tóxico	8.0	32.0	38.0	32.0
A-20	54.1	0/20	tóxico	14.0	36.0	36.0	29.0
A-21	52.5	0/20	tóxico	13.0	35.0	54.0	27.0
A-22	48.0	3/20	tóxico	7.0	57.0	62.0	55.0
A-23	47.5	1/20	tóxico	11.0	55.0	77.0	40.0
A-24	47.0	0/20	tóxico	8.0	42.0	55.0	37.0
A-25	46.4	1/20	tóxico	9.0	114.0	107.0	80.0
A-26	43.8	0/20	tóxico	7.0	36.0	45.0	37.0
A-27	43.6	1/20	tóxico	11.0	38.0	47.0	34.0
A-28	40.5	2/20	tóxico	10.0	72.0	47.0	32.0
A-29	37.2	0/20	tóxico	9.0	46.0	71.0	57.0
A-30	37.0	1/20	tóxico	8.0	40.0	55.0	40.0
A-31	36.3	0/20	tóxico	10.0	50.0	70.0	36.0
A-32	35.9	0/20	tóxico	9.0	33.0	44.0	26.0
A-33	35.9	0/20	tóxico	9.0	43.0	66.0	35.0
A-34	34.0	0/20	tóxico	14.0	49.0	57.0	36.0
A-35	32.5	3/20	tóxico	9.0	53.0	63.0	37.0
A-36	31.8	1/20	tóxico	5.0	39.0	91.0	81.0
A-37	28.6	2/20	tóxico	10.0	44.0	57.0	40.0
A-38	26.5	2/20	tóxico	9.0	62.0	76.0	47.0
A-39	25.8	1/20	tóxico	12.0	70.0	63.0	6.0
A-40	25.7	2/20	tóxico	7.0	68.0	74.0	75.0
A-41	24.4	0/20	tóxico	7.0	56.0	71.0	73.0
A-42	23.5	0/20	tóxico	9.0	59.0	91.0	39.0
A-43	23.5	1/20	tóxico	9.0	73.0	63.0	45.0
A-44	23.4	0/20	tóxico	10.0	88.0	63.0	98.0
A-45	23.0	3/20	tóxico	8.0	60.0	52.0	38.0
A-46	19.0	1/20	tóxico	9.0	63.0	71.0	78.0
A-47	18.5	0/20	tóxico	10.0	59.0	74.0	55.0
A-48	18.4	0/20	tóxico	10.0	59.0	74.0	55.0
A-49	18.0	4/20	tóxico	9.0	65.0	52.0	41.0
A-50	16.0	3/20	tóxico	9.0	48.0	67.0	35.0
A-51	15.0	5/20	tóxico	8.0	39.0	76.0	56.0
A-52	12.5	1/20	tóxico	7.0	64.0	79.0	78.0
A-53	12.2	1/20	tóxico	10.0	59.0	77.0	63.0
A-54	11.0	2/20	tóxico	10.0	43.0	66.0	35.0
A-55	10.6	2/20	tóxico	10.0	74.0	54.0	37.0
A-56	6.8	2/20	tóxico	12.0	63.0	66.0	68.0
A-57	1.8	3/20	tóxico	10.0	94.0	100.0	75.0

vidieron estas muestras en grupos presentados en la tabla No. 3, correspondiendo éstos a un mismo lote fraccionado en varios garrafones. En la tabla No. 4 se presentaron los grupos que eran de igual lote pero con diferente tratamiento térmico.

En la tabla No.3 puede observarse que cada grupo consta de muestras similares con un comportamiento muy semejante en la prueba de toxicidad y leucocitosis. La figura 1 esquematiza a los grupos 1, 2, 3 y 4. Estos cuatro grupos tienen su punto máximo de leucocitosis al quinto día y sus valores disminuyen al séptimo. Todas ellas forman líneas casi paralelas y el grupo 4 tuvo iguales resultados para ambos garrafones.

En la figura 2, los grupos 5 y 7 tienen gran similitud a los grupos anteriores, pero el grupo 6 para el garrafón 2 presentó el punto máximo al tercer día y siguió bajando en los subsiguientes, aunque el séptimo no llegó a valores normales. El grupo 8 tuvo un comportamiento totalmente contrario para los garrafones 1 y 2, ya que el 1 bajó al quinto día y volvió a subir al séptimo, modificando la respuesta que presentaron las muestras anteriores. La figura 3 nos presenta al grupo 10 y 11 como muestras muy semejantes ya que en ellas, existe una fracción que tuvo su máximo al tercer día y de ahí disminuyó, contraponiéndose al otro garrafón en el que el máximo fue al quinto día. El grupo 9 para los garrafones 2,3 y 4 tuvo un comportamiento paralelo, pero el garrafón 1 disminuyó aún más, al día 7, lo cual hizo que la respuesta fuera diferente a las anteriores.

En la tabla No. 4 en donde los grupos representan iguales lotes con diferente tratamiento térmico, se encuentra que algunas muestras son las mismas que las de la tabla anterior, ya que en algunos casos la muestra original se fraccionó, y recibió un sólo tratamiento térmico y luego se volvió a unir, teniendo para el segundo calentamiento una sola muestra. Para eliminar las varia-

Tabla 3 Relación entre Toxicidad y Leucocitosis para diferentes grupos que corresponden a un mismo lote fraccionado en varias muestras.

Muestras	Peso ganado	No. muertos	Resultado	Número de Leucocitos (10^3)/mm ³ por día:			
				0	3	5	7
Grupo 1							
A-34 G(1)	34.0	0/20	tóxico	14.0	49.0	57.0	36.0
A-37 G(2)	28.6	2/20	tóxico	10.0	44.0	57.0	40.0
A-26 G(3)	43.8	0/20	tóxico	7.0	36.0	45.0	38.0
Grupo 2							
A-1 G(1)	127.0	0/20	atóxico	11.0	14.0	22.0	19.0
A-2 G(2)	116.9	0/20	atóxico	12.0	10.0	20.0	16.0
A-3 G(3)	112.9	0/20	atóxico	11.0	11.0	19.0	13.0
A-4 G(4)	101.6	1/20	atóxico	10.0	14.0	22.0	19.0
Grupo 3							
A-16 G(1)	66.0	2/20	tóxico	9.0	21.0	27.0	25.0
A-5 G(2)	84.0	1/20	atóxico	9.0	18.0	39.0	31.0
A-9 G(3)	72.7	0/20	atóxico	8.0	25.0	32.0	18.0
Grupo 4							
A-11 G(1)	61.3	0/20	atóxico	16.0	30.0	70.0	30.0
A-14 G(2)	58.0	0/20	atóxico	17.0	30.0	70.0	30.0
Grupo 5							
A-17 G(1)	57.4	2/20	tóxico	11.0	47.0	49.0	34.0
A-20 G(2)	54.1	0/20	tóxico	14.0	36.0	36.0	29.0
A-21 G(3)	52.5	0/20	tóxico	13.0	35.0	54.0	27.0
Grupo 6							
A-18 G(1)	55.4	2/20	tóxico	11.0	42.0	66.0	37.0
A-28 G(2)	40.5	2/20	tóxico	10.0	72.0	47.0	32.0
Grupo 7							
A-23 G(1)	47.5	1/20	tóxico	11.0	55.0	72.0	40.0
A-27 G(2)	43.6	1/20	tóxico	11.0	38.0	47.0	34.0
A-35 G(3)	32.5	3/20	tóxico	9.0	53.0	63.0	37.0

Tabla 3 . Relación entre Toxicidad y Leucocitosis para diferentes grupos que correspondan a un mismo Lote fraccionado en varias muestras (Continuación)

Muestras	Peso ganado	No. muertos	Resultado	Número de Leucocitos (10^3)/mm ³ por día:			
				0	3	5	7
Grupo 8							
A-44 G(1)	23.4	0/20	tóxico	10.0	88.0	83.0	98.0
A-53 G(2)	12.2	1/20	tóxico	10.0	59.0	77.0	63.0
Grupo 9							
A-38 G(1)	26.5	2/20	tóxico	9.0	62.0	76.0	47.0
A-52 G(2)	12.5	1/20	tóxico	7.0	64.0	79.0	78.0
A-40 G(3)	25.7	2/20	tóxico	7.0	68.0	74.0	75.0
A-41 G(4)	24.4	0/20	tóxico	7.0	56.0	71.0	73.0
Grupo 10							
A-42 G(1)	23.5	0/20	tóxico	9.0	59.0	91.0	39.0
A-43 G(2)	23.5	1/20	tóxico	9.0	73.0	63.0	45.0
Grupo 11							
A-45 G(1)	23.0	3/20	tóxico	8.0	57.0	52.0	38.0
A-50 G(2)	16.0	3/20	tóxico	9.0	48.0	67.0	35.0

G(1) , G(2) , G (3) : Corresponden a los garrafones 1, 2 y 3 en que se fraccionó la muestra original y que fueron evaluados por separado.

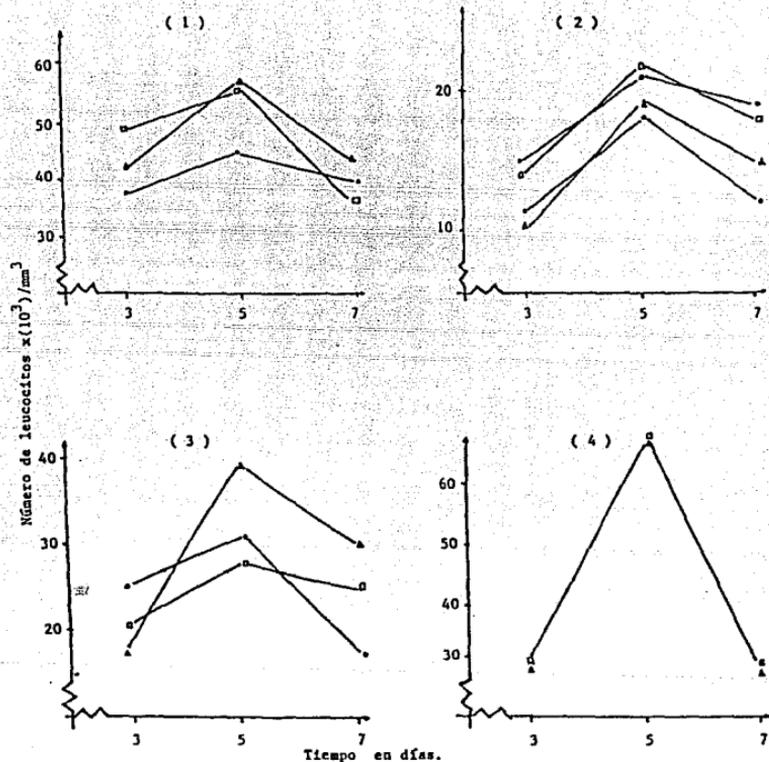


Figura 1. Leucocitos producida en ratones inoculados con la Vacuna pertussis. Los gráficos corresponden a muestras, de un mismo lote, que fueron fraccionados en diferentes garrafones.

1 y 3 son muestras separadas en uno (□) y tres (○) garrafones; 4 sólo en dos, y 2 hasta en cuatro (●) fracciones.

Garrafón 1 (□), garrafón 2 (△), garrafón 3 (○), garrafón 4 (●).

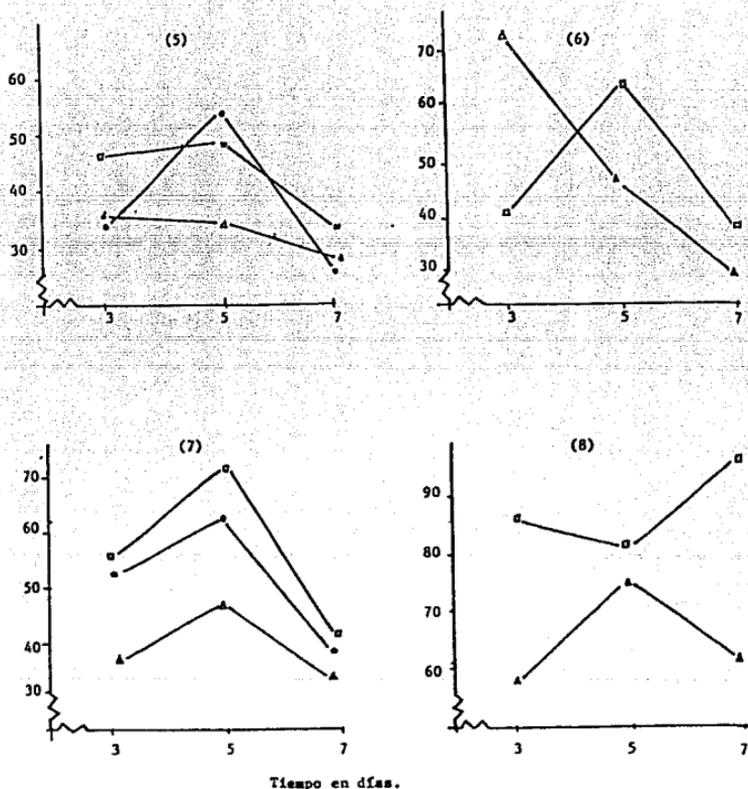


Figura 2. Leucocitosis producida en ratones inoculados con la vacuna pertussis. Los gráficos corresponden a muestras, de un mismo lote, que fueron fraccionadas en diferentes garrafones. (5) y (7) son muestras separadas en uno (□), dos (△), y tres (●) garrafones; (6) y (8) sólo se repartieron en dos. Garrafón 1 (□), garrafón 2 (△), garrafón 3 (●), garrafón 4 (●).

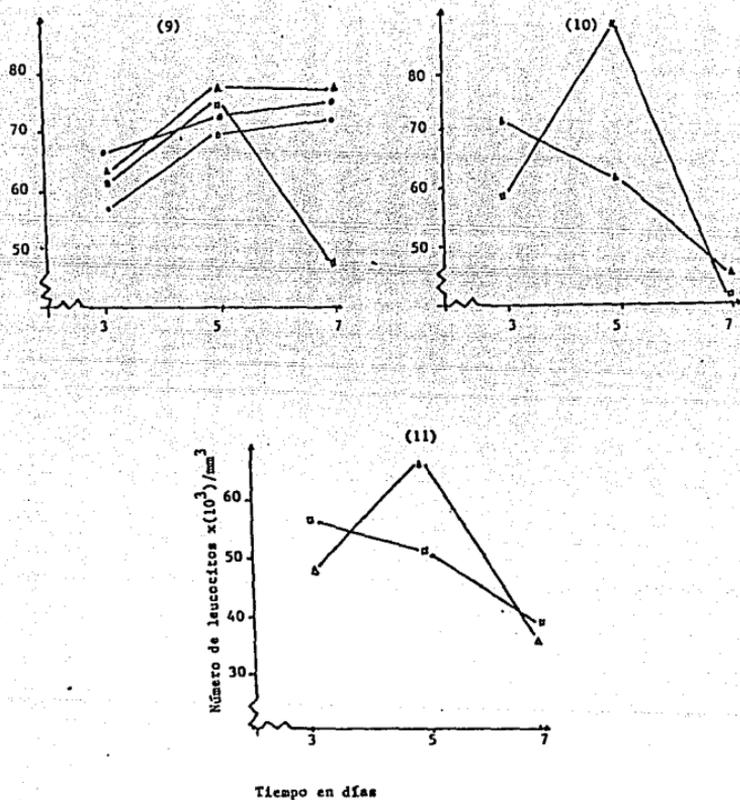


Figura 3. Leucocitosis producida en ratones inoculados con la vacuna pertussis. Los gráficos corresponden a muestras, de un mismo lote, que fueron fraccionados en diferentes garrafones. (10) y (11) son muestras separadas en uno (□) y dos (△) garrafones. (9) se repartió además en tres (●) y hasta cuatro (○) garrafones. Garrafón 1 (□), garrafón 2 (△), garrafón 3 (●), garrafón 4 (○).

Tabla 4. Relación entre Toxicidad y Leucocitosis para diferentes grupos que corresponden a iguales Lotes con diferente tratamiento t_ér_mico.

Muestra	# trat. t _é r _m ico	Peso ganado	No. muertos	Resultado	Número de Leucocitos (10 ³)/mm ³ por día:			
					0	3	5	7
Grupo a								
A-34	uno	34.0	0/20	tóxico	14.0	49.0	57.0	36.0
A-37	uno	28.6	2/20	tóxico	10.0	44.0	57.0	40.0
A-26	uno	43.8	0/20	tóxico	7.0	36.0	45.0	38.0
\bar{X}	uno	35.5	1/20	tóxico	10.0	43.0	53.0	38.0
Grupo b								
A-30	uno	37.0	0/20	tóxico	9.0	40.0	55.0	40.0
A-24	dos	47.0	0/20	tóxico	8.0	42.0	55.0	37.0
A-19	tres	55.0	9/20	tóxico	8.0	32.0	38.0	32.0
Grupo c								
A-46	uno	19.0	1/20	tóxico	9.0	63.0	71.0	78.0
A-22	dos	48.0	3/20	tóxico	7.0	57.0	62.0	55.0
Grupo d								
A-44	uno	23.4	0/20	tóxico	10.0	88.0	83.0	98.0
A-53	uno	12.2	1/20	tóxico	10.0	59.0	77.0	63.0
\bar{X}	uno	17.8	1/20	tóxico	10.0	73.0	80.0	81.0
A-23	dos	47.5	1/20	tóxico	11.0	55.0	77.0	40.0
A-27	dos	43.6	1/20	tóxico	11.0	38.0	47.0	34.0
A-35	dos	32.5	3/20	tóxico	9.0	53.0	64.0	37.0
\bar{X}	dos	41.2	2/20	tóxico	11.0	49.0	63.0	37.0
Grupo e								
A-57	uno	1.8	3/20	tóxico	10.0	94.0	100.0	75.0
A-25	dos	46.4	1/20	tóxico	9.0	114.0	107.0	80.0

Tabla 4. Relacion entre toxicidad y Leucocitosis para diferentes grupos que corresponden a iguales Lotes con diferente tratamiento térmico.

(Continuación)

Muestra	trat. térmico	Peso ganado.	No. muertos	Resultado	Número de Leucocitos(10^3)/mm ³ por día:			
					0	3	5	7
Grupo f								
A-47	uno	18.5	0/20	tóxico	10.0	59.0	74.0	55.0
A-29	dos	37.3	0/20	tóxico	10.0	46.0	71.0	57.0
Grupo g								
A-56	uno	6.8	2/20	tóxico	12.0	63.0	66.0	67.0
A-31	dos	36.3	0/20	tóxico	10.0	50.0	70.0	36.0
Grupo h								
A-54	uno	11.0	2/20	tóxico	10.0	43.0	65.0	35.0
A-32	dos	35.9	0/20	tóxico	9.0	33.0	44.0	28.0
A-33	dos	35.9	0/20	tóxico	14.0	43.0	66.0	35.0
\bar{X}	dos	35.9	0/20	tóxico	11.0	38.0	55.0	32.0

\bar{X} : Promedio de muestras repartidas en diferentes garrafones que recibieron el mismo tratamiento térmico

ciones de estos diferentes garrafones se hizo un promedio de los valores de aquellas muestras que hubiesen recibido el mismo número de calentamientos.

Las figuras 4 y 5 esquematizan estos lotes que fueron estudiados cuando tenían un solo tratamiento térmico, cuando fueron calentados por segunda vez y, a veces, cuando se intentó la destoxificación con un tercer calentamiento.

En la figura 4 se puede observar como los grupos: a, c y d demuestran que un segundo calentamiento disminuye grandemente la leucocitosis y por lo tanto la toxicidad. El grupo b, es muy interesante, ya que al recibir un segundo calentamiento la toxicidad permaneció casi sin cambio, y requirió de un tercer calentamiento para disminuir y demostrar como este tratamiento si abate la toxicidad.

En la figura 5 para el grupo e, se muestra que lo anterior no se presenta en todos los casos ya que después de calentar, la leucocitosis se incrementó, además de que los valores están muy por encima del valor basal que es de 9,000 a 11,000 cel/mm³. Los grupos f, g y h siguieron la pauta de los anteriores mostrando una leucocitosis menos marcada después del calentamiento.

Cabe mencionar que las muestras con alta leucocitosis inicial, difícilmente disminuirían sus valores aún con el calentamiento, como lo es el grupo e, c, f y g que aunque mostraron un decremento con el segundo calentamiento sus valores siempre estuvieron por encima de 40,000 cel/mm³ y no disminuyeron a menos de 30,000 cel/mm³ al séptimo día, por lo que la leucocitosis se prolongó mucho más que en grupos como el h, a y b en que los valores subieron poco, manteniendo una curva menos pronunciada.

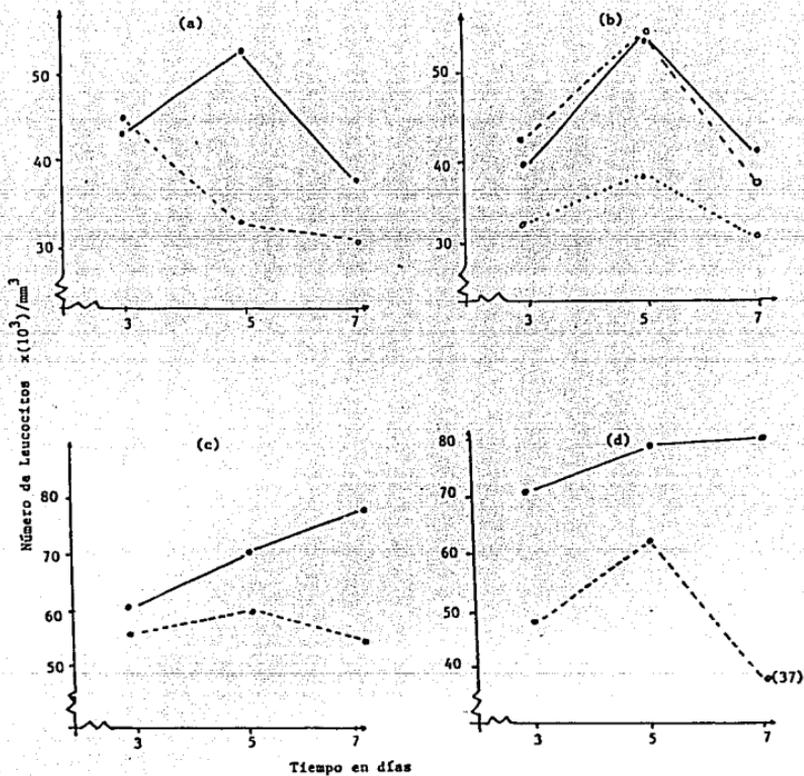


Figura 4. Leucocitosis producida en ratones inoculados con la vacuna pertussis. Los gráficos corresponden a muestras que han recibido diferente tratamiento térmico. (a), (b) y (d) son muestras que recibieron uno (—) y dos (---) tratamientos térmicos; y (b), es una muestra que recibió hasta tres (...) tratamientos térmicos.

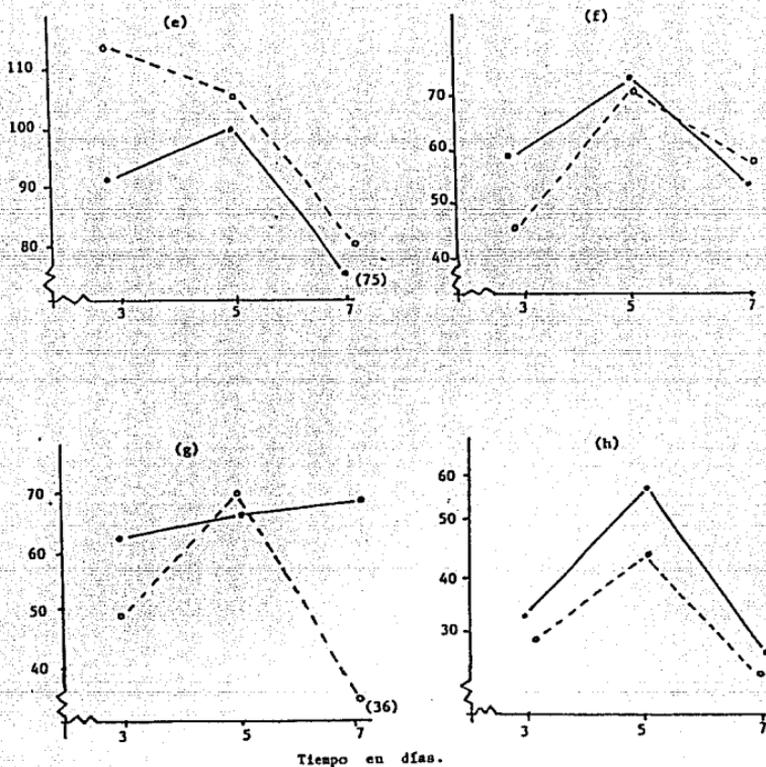


Figura 5. Leucocitosis producida en ratones inoculados con la vacuna pertussis. Los gráficos corresponden a muestras que han recibido diferentes tratamientos térmicos. (e), (f), (g) y (h) son muestras que recibieron uno (—) y dos (---) tratamientos térmicos.

(58)

B. EFECTO DE LA CONCENTRACION CELULAR EN LA ACTIVIDAD DEL FACTOR PROMOTOR DE LEUCOCITOSIS.

Para poder demostrar el efecto de la concentración celular sobre la actividad del factor promotor de leucocitosis, se trabajaron 11 muestras obtenidas al final de la fermentación, a las cuales se les determinaron las unidades de opacidad para conocer el número de microorganismos contenidos en las mismas y poder variar la concentración mediante diluciones, conforme nuestras necesidades así lo requirieran. Las unidades de opacidad obtenidas para cada muestra fueron las siguientes:

TABLA 5

MUESTRA	CEPA	OPACIDAD (UOP/ml)
B-1	165	140
B-2	165	330
B-3	165	280
B-4	134	370
B-5	134	410
B-6	134	240
B-7	509	220
B-8	509	240
B-9	509	180
B-10	509	310
B-11	509	430

Con cada muestra se realizaron una serie de diluciones para obtener concentraciones celulares que variaban desde 5 UOP hasta 13 UOP para determinar el nú

mero de leucocitos a los días 3, 5 y 7 después de inocular. Los resultados obtenidos fueron agrupados de acuerdo a la cepa de cada muestra (cepas 165, 134 y - 509) y se encuentran en las tablas 6, 7 y 8 respectivamente.

Las tablas nos muestran las variaciones en el número de leucocitos conforme variaba la concentración celular, comparados con el valor normal de leucocitos - en ratón que fue de 9.0 a 11.0×10^3 celulas/mm³.

Así mismo, se observó claramente la actividad que tiene el FPL en el ratón; en general aumento el número de leucocitos al tercer día, alcanzando el punto - máximo al quinto día, para finalmente disminuir al séptimo día (figuras 6 y 11).

Si analizamos las figuras que ilustran algunos de los resultados, podemos - observar lo siguiente:

Los puntos máximos del número de leucocitos se alcanzaron en general a las - concentraciones de 12 y 13 UOP, mientras que los más bajos fueron a 5 y 6 UOP. - (B-1 , B-2, B-4, B-5, B-6, B-7, B-11).

Hubo algunas muestras que tuvieron su punto máximo de leucocitosis al ter - cer día, disminuyendo al quinto día y aún más al séptimo, tal es el caso de B-2, (figura 7), B-5 (figura 9) y B-10.

También se encontraron muestras en las cuales los valores de leucocitosis - no disminuyeron ni aún al séptimo día como se observa en los valores de B-8.

Algunas de las muestras tuvieron valores menores de 60.0×10^3 Leuc/mm³ aún a 13 UOP, tal es el caso de B-1 (figura 6), B-2 (figura 7) y B-3 de la cepa - 165, B-6 de la cepa 134 y B-8, B-9 y B-10 de la cepa 509 (figura 12).

Si comparamos el número de leucocitos producidos por cada cepa a una concen - tración celular dada, encontramos lo siguiente:

A 5 UOP la respuesta de la cepa 509 y 165 fue menor de 32.0×10^3 leucocitos /mm³ mientras que la suspensión de la cepa 134 fue mayor que este valor (figura- 13).

Tabla 6. Efecto de la concentración celular sobre la actividad del Factor Promotor de leucocitosis de Bordetella pertussis cepa 165.

Muestra	Opacidad (UOP/ml)	Número de Leucocitos $\times 10^3/\text{mm}^3$ a los días:		
		3	5	7
B-1	5	17.0	22.0	28.0
	6	15.0	29.0	25.0
	7	18.0	25.0	28.0
	8	18.0	28.0	24.0
	9	25.0	36.0	25.0
	10	24.0	39.0	33.0
	11	21.0	30.0	32.0
	12	32.0	57.0	30.0
	13	32.0	47.0	34.0
B-2	5	32.0	27.0	22.0
	6	31.0	33.0	28.0
	7	31.0	31.0	32.0
	8	40.0	39.0	34.0
	9	37.0	37.0	33.0
	10	34.0	47.0	37.0
	11	40.0	34.0	36.0
	12	46.0	44.0	39.0
	13	46.0	46.0	36.0
B-3	5	22.0	19.0	18.0
	6	22.0	21.0	20.0
	7	21.0	21.0	20.0
	8	21.0	13.0	19.0
	9	20.0	28.0	17.0
	10	20.0	14.0	18.0
	11	20.0	20.0	20.0
	12	20.0	17.0	21.0
	13	21.0	14.0	19.0

Número normal de Leucocitos en ratón: $9.0-11.0 \times 10^3/\text{mm}^3$

Tabla 7. Efecto de la concentración celular sobre la actividad del factor promotor de leucocitosis de Bordetella pertussis cepa 134.

Muestra	Opacidad (UOP/ml)	Número de Leucocitos $\times (10^3) / \text{mm}^3$ a los días:		
		3	5	7
B-4	5	59.0	44.0	38.0
	6	55.0	37.0	33.0
	7	61.0	25.0	39.0
	8	70.0	45.0	31.0
	9	62.0	54.0	39.0
	10	76.0	61.0	42.0
	11	70.0	82.0	46.0 (4)
	12	62.0	95.0 (3)	47.0 (3)
	13	75.0	110.0 (3)	68.0 (2)
B-5	5	38.0	23.0	23.0
	6	27.0	33.0	30.0
	7	30.0	25.0	27.0
	8	60.0	64.0 (3)	31.0 (3)
	9	61.0	41.0 (4)	27.0 (4)
	10	57.0	40.0	30.0
	11	46.0	42.0	27.0
	12	55.0	49.0	28.0
	13	62.0	61.0 (4)	38.0 (4)
B-6	5	27.0	17.0	29.0
	6	30.0	21.0	22.0
	7	30.0	26.0	35.0
	8	36.0	30.0	34.0
	9	36.0	32.0	29.0
	10	35.0	35.0	34.0
	11	36.0	34.0	35.0
	12	33.0	41.0	36.0
	13	38.0	36.0	44.0

Nota: Los números que se encuentran entre el paréntesis indican el número de ratones sobrevivientes de un total de 5.

Número normal de Leucocitos en ratón: $9.0 - 11.0 \times 10^3 / \text{mm}^3$

Tabla 8 . Efecto de la concentración celular sobre la actividad del factor promotor de leucocitosis de Bordetella pertussis cepa 509.

Muestra	Opacidad (UOP/ml)	Número de leucocitos $\times 10^3/mm^3$ a los días:		
		3	5	7
B-7	5	19.0	23.0	24.0
	6	42.0	36.0	32.0
	7	70.0	34.0	26.0
	8	65.0	51.0	45.0
	9	37.0	54.0	33.0
	10	71.0	62.0	39.0
	11	41.0	74.0	38.0
	12	66.0	79.0 (4)	65.0 (2)
	13	80.0	115.0 (3)	80.0 (3)
B-8	5	17.0	22.0	21.0
	6	18.0	23.0	23.0
	7	19.0	21.0	22.0
	8	20.0	19.0	27.0
	9	20.0	22.0	22.0
	10	17.0	19.0	23.0
	11	19.0	21.0	22.0
	12	17.0	21.0	25.0
	13	21.0	21.0	24.0
B-9	5	19.0	31.0	26.0
	6	19.0	37.0	21.0
	7	22.0	36.0	20.0
	8	18.0	33.0	20.0
	9	22.0	38.0	24.0
	10	27.0	41.0	23.0
	11	19.0	41.0	24.0
	12	26.0	36.0	22.0
	13	23.0	51.0	22.0

Nota: Los números que se encuentran en el paréntesis indican el número de ratones sobrevivientes de un total de 5.

Número normal de Leucocitos en ratón: $9.0 - 11.0 \times 10^3/mm^3$

Tabla 8. Efecto de la concentración celular sobre la actividad del factor promotor de leucocitosis de Bordetella pertussis cepa 509.

(Continuación)

Muestra	Opacidad (UOP/ml)	Número de leucocitos $\times(10^3)/\text{mm}^3$ a los días:		
		3	5	7
B-10	5	26.0	24.0	21.0
	6	33.0	23.0	27.0
	7	29.0	23.0	21.0
	8	37.0	26.0	30.0
	9	31.0	32.0	22.0
	10	35.0	32.0	21.0
	11	47.0	31.0	22.0
	12	31.0	30.0	25.0
	13	43.0	31.0	26.0
B-11	5	44.0	26.0	34.0
	6	54.0	45.0	42.0
	7	55.0	62.0	46.0
	8	41.0	68.0	31.0
	9	69.0	63.0	45.0
	10	75.0	84.0	52.0
	11	71.0	68.0	63.0
	12	57.0	68.0	63.0
	13	86.0	126.0	100.0

Número normal de leucocitos en ratón: $9.0 - 11.0 \times 10^3/\text{mm}^3$

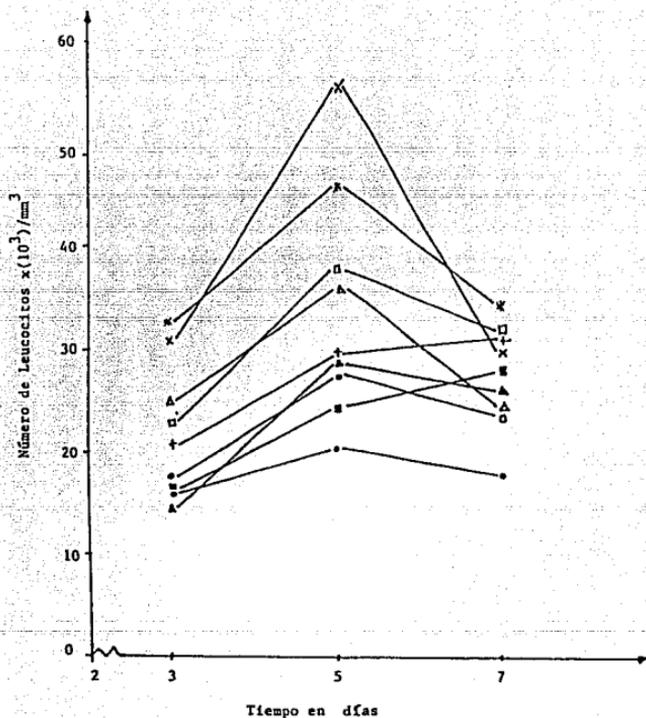


Figura 6. Leucocitosis producida en ratones inoculados con Vacuna pertussis (muestra B-1) cepa 165 a diferentes concentraciones celulares.

●—● 5 UOP ○—○ 8 UOP +—+ 11 UOP
 ▲—▲ 6 UOP △—△ 9 UOP ×—× 12 UOP
 ■—■ 7 UOP □—□ 10 UOP ◼—◼ 13 UOP

Número normal de leucocitos en ratón: $9.0-11.0 \times 10^3/\text{mm}^3$

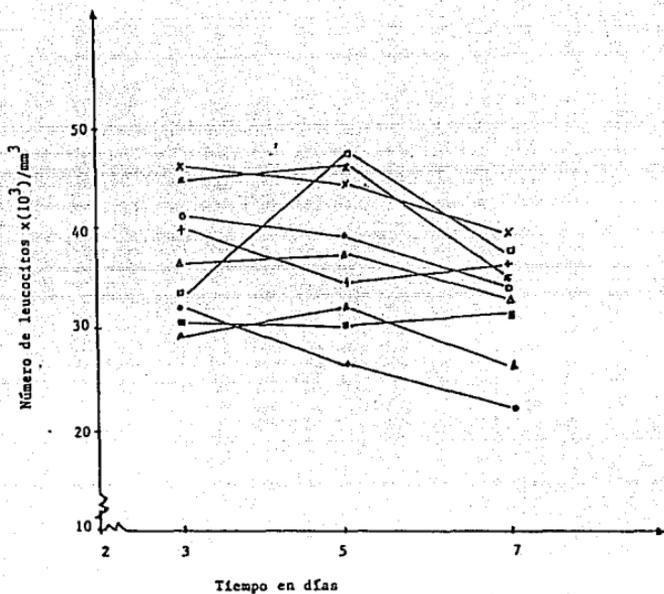


Figura 7. Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertussis (muestra B-2) cepa 165 a diferentes concentraciones celulares.

●—5 UOP ○—8 UOP +—11 UOP
 ▲—6 UOP △—9 UOP ×—12 UOP
 ■—7 UOP □—10 UOP *—13 UOP

Número normal de leucocitos en ratón es de $9.0 - 11.0 \times 10^3/\text{cm}^3$

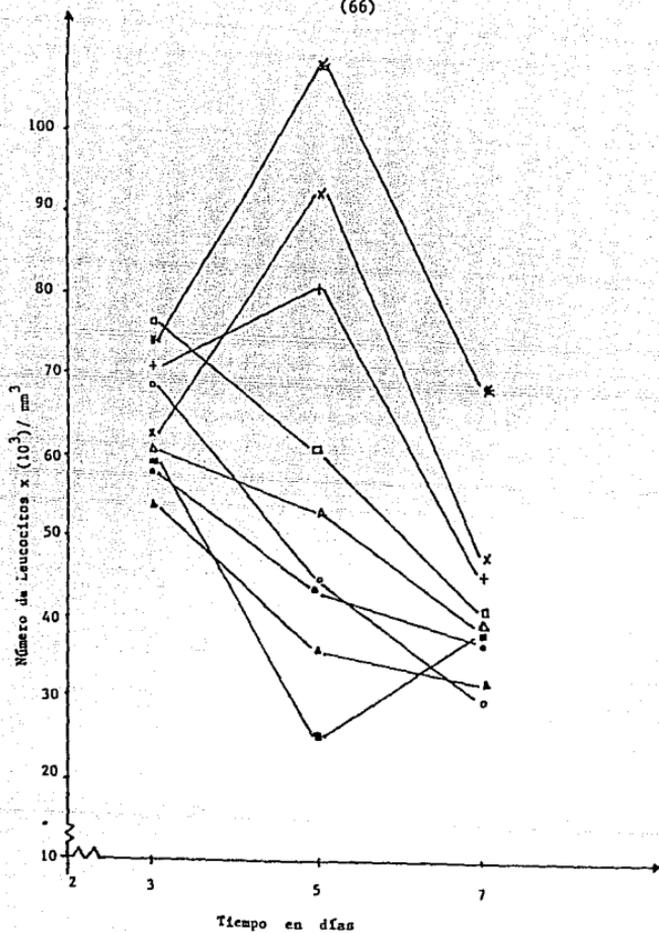


Figura 8. Leucocitosis producida en ratones inoculados con Vacuna pertussis (muestra B-4) cepa 134 a diferentes concentraciones celulares.

● → 5 UOP ○ → 8 UOP + → 11 UOP
 ▲ → 6 UOP △ → 9 UOP x → 12 UOP
 ■ → 7 UOP □ → 10 UOP * → 13 UOP.

Número de Leucocitos normal en ratón: $9.0 - 11.0 \times (10^3) / \text{mm}^3$

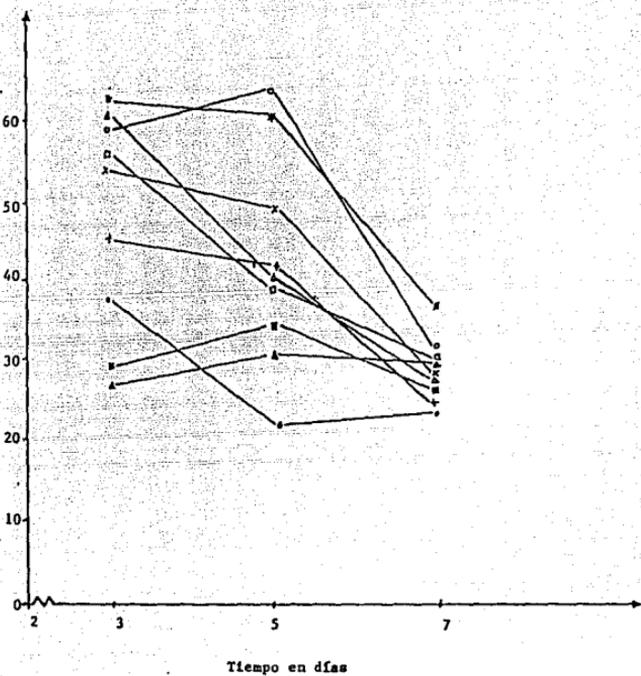


Figura 9. Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertussis (muestra B-5) cepa 134, a diferentes concentraciones celulares.

● — 5 UOP	○ — 8 UOP	+ — 11 UOP
▲ — 6 UOP	△ — 9 UOP	× — 12 UOP
* — 7 UOP	□ — 10 UOP	* — 13 UOP

Número normal de Leucocitos en ratón: es de $9.0 - 11.0 \times (10^3) / \text{mm}^3$

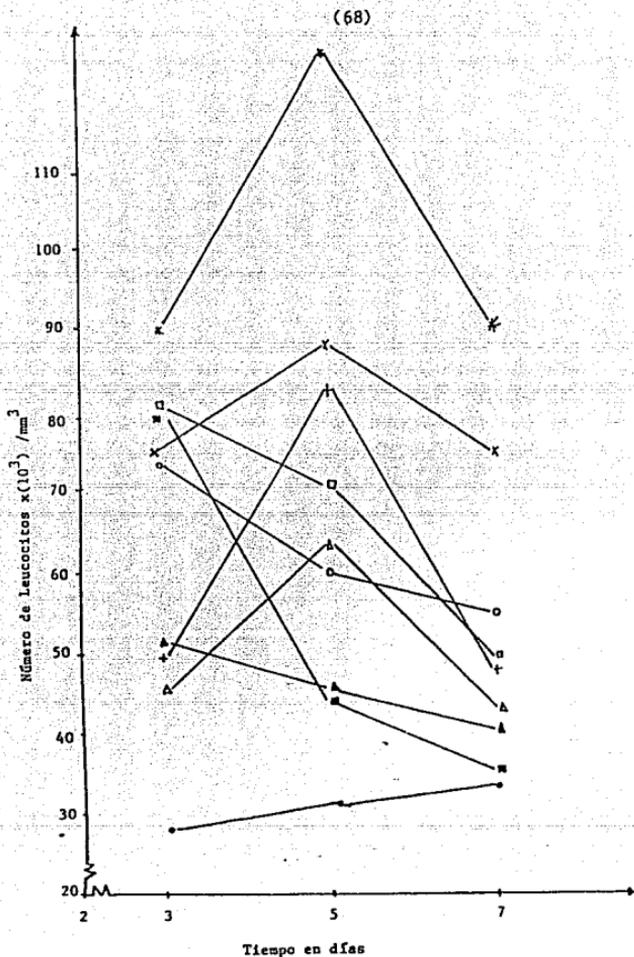


Figura 10. Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertussis (muestra B-7) cepa 509 a diferentes concentraciones celulares.

● 5 UOP ○ 8 UOP ◄ 11 UOP
 ▲ 6 UOP △ 9 UOP × 12 UOP
 ■ 7 UOP ▣ 10 UOP * 13 UOP

Número normal de leucocitos en ratón: $9.0 - 11.0 \times 10^3 / \text{mm}^3$

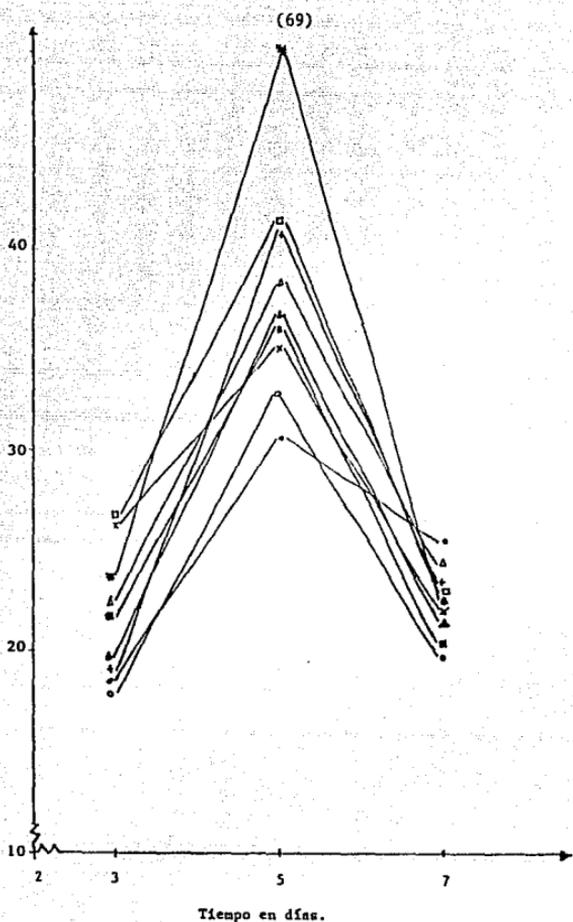


Figura 11. Leucocitosis producida en ratones inoculados con vacuna pertussis (muestra B-0) cepa 509 a diferentes concentraciones celulares.

●—● 5 UOP	○—○ 8 UOP	+—+ 11 UOP
▲—▲ 6 UOP	△—△ 9 UOP	×—× 12 UOP
■—■ 7 UOP	□—□ 10 UOP	#—# 13 UOP

Número normal de leucocitos en ratón: $9.0 - 11.0 \times (10^3) / \text{mm}^3$

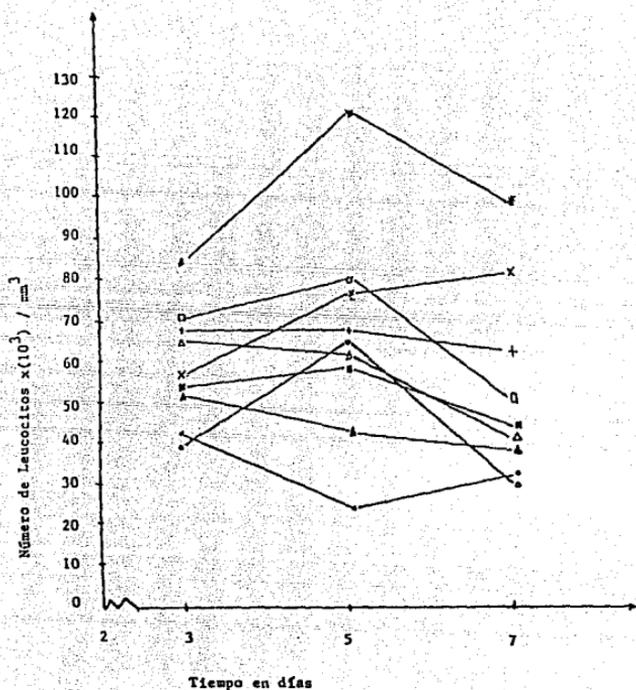


Figura 12. Leucocitosis producida en ratones inoculados con Vacuna pertussis (muestra B-11) cepa 509 a diferentes concentraciones celulares.

●— 5 UOP. ○— 8 UOP. +— 11 UOP.

▲— 6 UOP. △— 9 UOP. ×— 12 UOP.

■— 7 UOP. □— 10 UOP. ◀— 13 UOP.

Número de Leucocitos normal en ratón es de 9.0 a 11.0 $\times(10^3)/\text{cm}^3$

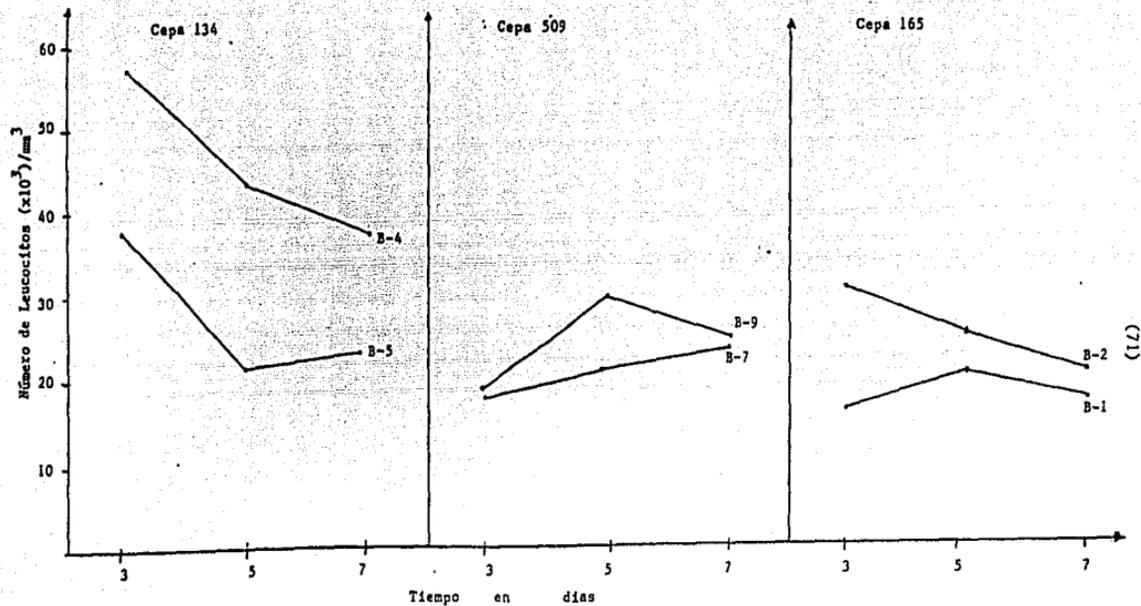


Figura 13. Leucocitosis producida en ratones inoculados con muestras de Vacuna pertussis de las cepas 134, 509 y 165 a una concentración celular de 5 UOP.

Número normal de Leucocitos = 9-11 (x10³)/mm³

(72)

A 7 UOP el número de leucocitos entre la cepa 134 y 509 fué muy similar, - valores arriba de 32.0×10^3 leucocitos/mm³ pero inferiores a 70.0×10^3 leucocitos/mm³ dando una respuesta muy irregular mientras que la cepa 165 se encontró aún por debajo de 32.0×10^3 leucocitos/mm³ (figura 14).

A 9 UOP la cepa 134 y 509 siguieron el comportamiento observado a 7 UOP - pero la respuesta se notó más definida, mientras que para la cepa 134 el punto máximo lo alcanzó al tercer día para disminuirlo al quinto día y aún más al séptimo día, en la cepa 509 se observó que la actividad de FPL aumentó al tercer día, alcanzando un punto máximo al quinto y disminuyendo al séptimo, al igual que en la cepa 165 pero en menor grado (es decir, por debajo de 37.0×10^3 Leucocitos/mm³ , (figura 15).

A 11 UOP la cepa 134 y 509 rebasaron los valores de 70.0×10^3 leucocitos/mm³ mientras que la cepa 165 no paso de los 40.0×10^3 leucocitos/mm³. La respuesta de la cepa 509 se mantuvo igual y la de la cepa 134 se empezó a comportar de forma similar (figura 16).

A 13 UOP las cepas 509 y 134 alcanzaron valores superiores a los 110.0×10^3 leucocitos/mm³ mientras que la cepa 165 apenas rebasó los 45.0×10^3 leucocitos/mm³ pero en ningún caso fueron mayores a 50.0×10^3 leucocitos/mm³. La respuesta de las tres fué semejante (figura 17).

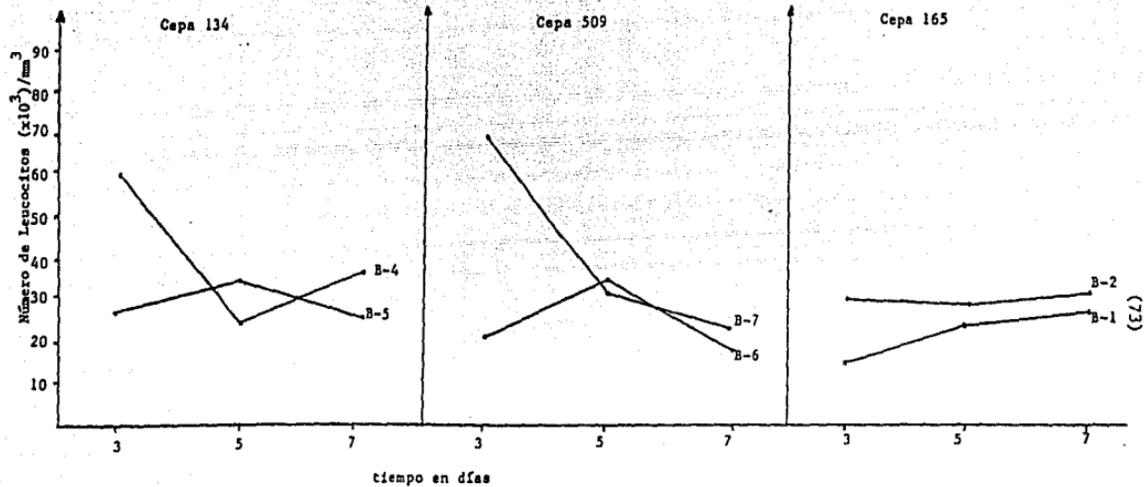


Figura 14. Leucocitosis producida en ratones inoculados con muestras de Vacuna pertussis de las cepas 134, 509 y 165 a una concentración celular de 7 UOP.

Número normal de Leucocitos en ratón = 9-11 ($\times 10^3$) / mm³

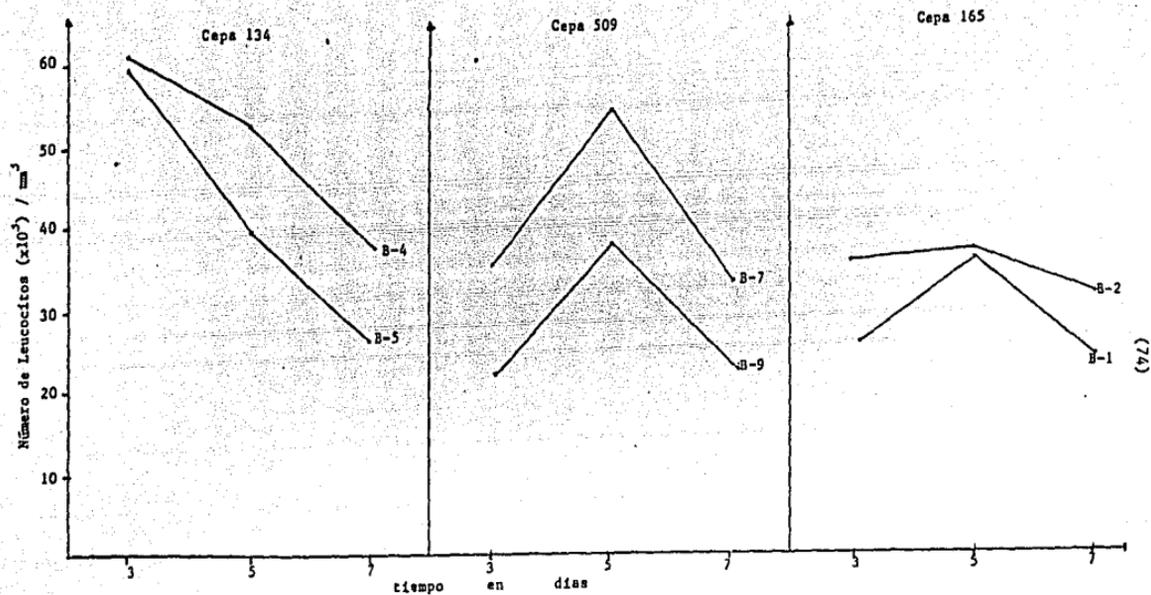


Figura 15 Leucocitosis producida en ratones inoculados con muestras de vacuna pertussis de las cepas 134, 509 y 165 a una concentración celular de 9 UOP.

Número normal de Leucocitos en ratón = 9-11 $(\times 10^3)/\text{mm}^3$

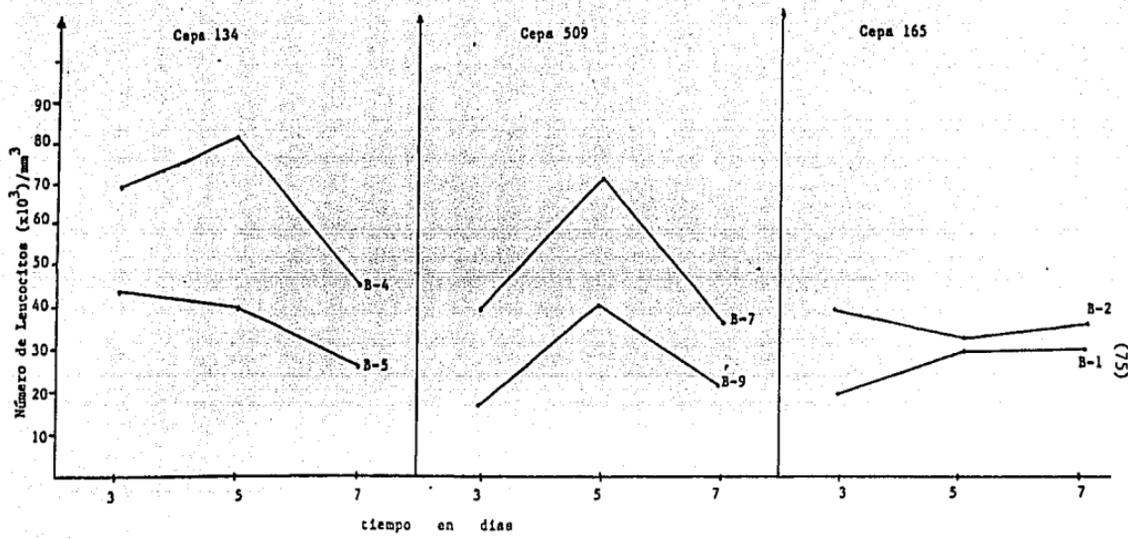


Figura 16. Leucocitosis producida en ratones inoculados con muestras de vacuna pertussis de las cepas 134, 509 y 165 a una concentración celular de 11 UOP.

Número normal de Leucocitos en ratón = 9-11 ($\times 10^3$) / mm^3

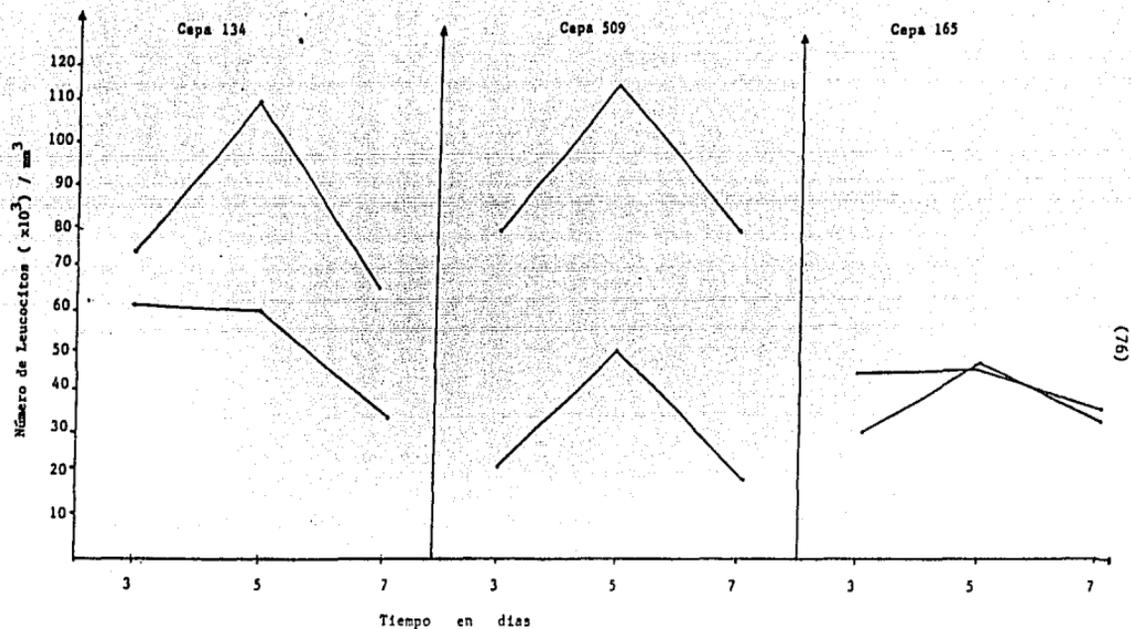


Figura 17. Leucocitosis producida en ratones inoculados con muestras de Vacuna pertussis de las cepas 134, 509 y 165 a una concentración celular de 13 UOP.

Número normal de Leucocitos en ratón = 9-11 ($\times 10^3$)/ cm^3

C.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR PROMOTOR DE LEUCOCITOSIS DURANTE LA PRODUCCION DE LA VACUNA PERTUSSIS.

En cuanto al seguimiento de producción de la actividad de FPL se obtuvieron los siguientes resultados:

Primeramente mediante una reacción dermonecrótica en el lomo de los animales se observó la actividad de la toxina que para la cepa 134, 509 y 165 se obtuvieron resultados similares, ya que los 13 lotes trabajados dieron reacción positiva para muestras no detoxificadas, lo cual podemos constatar observando en la tabla 9, las muestras no determinadas se debieron a falta de material biológico.

La actividad de FPL a diferentes tiempos de proceso fue comparada al quinto día después de inoculados los animales, observando que la cepa 134 presentó una elevación máxima a las 10 horas, con un comportamiento similar para dos de los lotes trabajados y un comportamiento ligeramente diferente para un tercer lote, ya que las primeras muestras no se evaluaron por estar contaminadas, esto se puede observar en la figura 18 y en la tabla 10, así mismo podemos observar que el comportamiento fue más drástico en comparación con las otras cepas trabajadas.

Para la cepa 509 se observó una respuesta más constante en los 5 lotes trabajados, y como podemos observar en la figura 19 y la tabla 11 hay una máxima elevación en un rango de 30 a 35 horas, para tres de los lotes trabajados con dos excepciones en lotes de la cepa 509 que nunca sufrieron una elevación significativa, y todos los valores durante el proceso se mantienen muy cercanos entre sí.

Respecto a la cepa 165, ésta mostró un comportamiento variable aunque en general se observó una máxima leucocitosis para tres lotes trabajados a las 35 horas del proceso. En este caso dos de los lotes de la cepa 165 mostraron un

TABLA 9 Actividad de TDN durante el proceso de producción de Vacuna pertussis utilizando lotes con y sin tratamiento térmico de cepas 134, 509 y 165.

Cepa	Lote	Tratamiento térmico	Tiempo del proceso en horas									
			0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
134	C-1	no	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C-2	no	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C-3	no	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
509	C-4	no	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C-5	no	no se determino									
		si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C-6	no	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C-7	no	no se determino									
si		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
165	C-9	no	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
		si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C-11	no	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C-12	no	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
		si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C-13	no	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
si	no se determino											

(78)

Tabla 10 Actividad de FPL durante el proceso de producción de Vacuna Pertussis con la Cepa 134.

Lote	Número de Leucocitos (10^3)/mm ³ al quinto día inducidos por la cepa 134 a diferentes tiempos de proceso en horas.								
	0	5	10	15	20	25	30	35	40
C-1	ND	ND	ND	ND	ND	39.0	42.0	44.0	32.0
C-2	18.0	19.0	32.0	17.0	16.0	17.0	16.0	17.0	15.0
C-3	24.0	23.0	29.0	26.0	26.0	24.0	20.0	21.0	23.0

Número normal de Leucocitos en ratón 9-11 (10^3)/mm³

ND= No se determino

(79)

ESTR
TOS
NO
PBBE
SALA
DE
LA
BIBLIOTECA

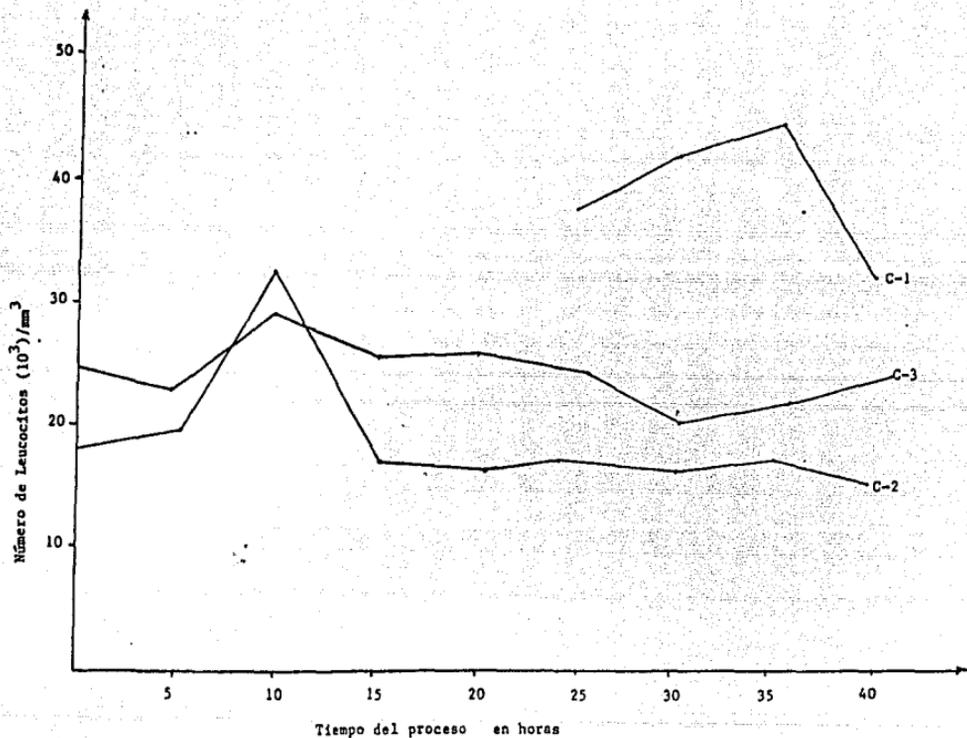


Figura 18 Leuconitosis producida en ratón al quinto día, durante el proceso de producción de Vacuna pertuensis con la Cepa 134.

Tabla 11 Actividad de FPL durante el proceso de producción de Vacuña pertussis con la cepa 509.

Lote	Número de Leucocitos($\times 10^3$)/ mm^3 al quinto día, inducidos por la cepa 509 a diferentes tiempos de proceso en horas.									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
C-4	10.0	ND	ND	ND	12.0	24.0	38.0	49.0	54.0	
C-5	23.0	21.0	19.0	22.0	22.0	28.0	27.0	22.0		
C-6	21.0	19.0	22.0	21.0	20.0	24.0	21.0	20.0		
C-7	21.0	ND	21.0	37.0	54.0	55.0	ND	80.0	65.0	60.0
C-8	25.0	22.0	27.0	25.0	28.0	28.0	36.0	37.0	25.0	23.0

Número normal de Leucocitos en ratón de 9 a 11 ($\times 10^3$)/ mm^3

ND= No se determinó

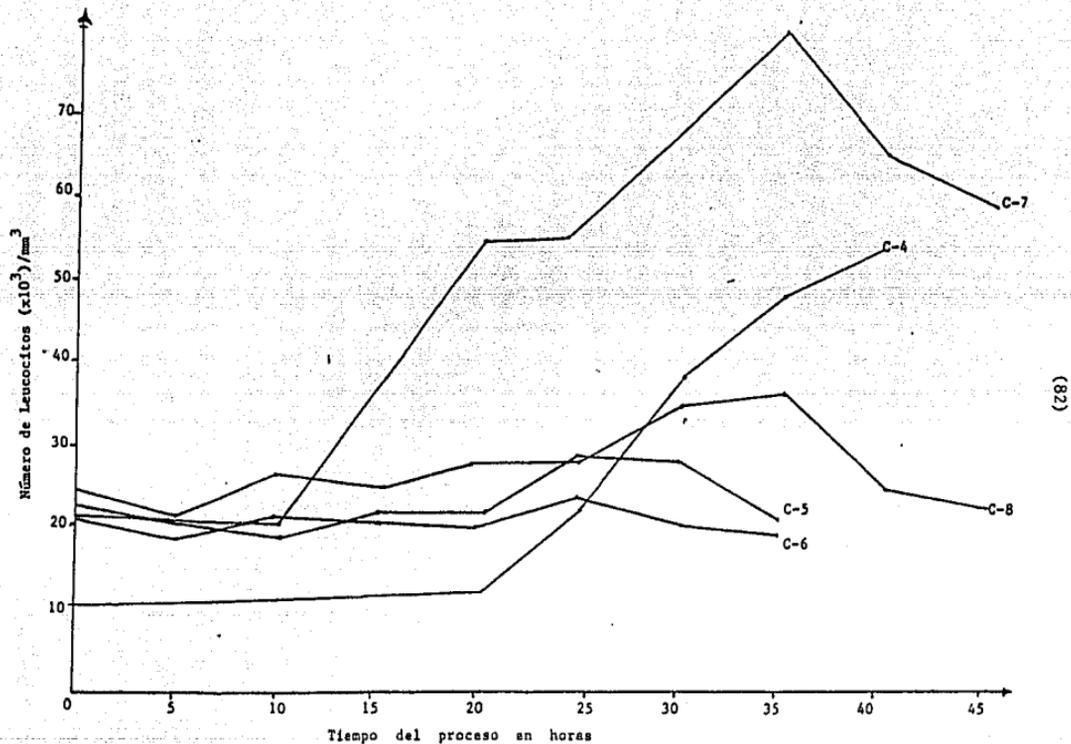


Figura 19 Leucocitosis producida en raton al quinto día, durante el proceso de producción de Vacuna pertussis con la Cepa 509.

comportamiento diferente al anteriormente señalado, ya que al igual de lo que pasa con los lotes de las cepas 509, éstos también amntuvieron valores muy similares durante todo el proceso, y no mostraron elevación significativa en nin gún tiempo. (Tabla 12 y Figura 20).

Durante el muestreo y trabajo con material biológico la cepa 509 fue la - que dió mejores resultados; la 134 tuvo efectos más drásticos al inicio y después se mantuvo estable; y la 165 tuvo diversos comportamientos entre los mismos lotes, ya que algunas veces mostró buenos resultados y en otras, estos fue ron desiguales y con poca consistencia.

Tabla 12 Actividad de FPL durante el proceso de producción de Vacuna pertussis con la Cepa 165.

Lote	Número de Leucocitos ($\times 10^3$) / mm^3 al quinto día, inducidos por la Cepa 509 a diferentes tiempos de proceso en horas.									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
C-9	16.0	17.0	17.0	21.0	23.0	22.0	21.0	37.0	19.0	21.0
C-10	26.0	26.0	25.0	28.0	19.0	20.0	24.0	30.0	22.0	
C-11	13.0	ND	13.0	13.0	15.0	ND	15.0	10.0		
C-12	24.0	27.0	28.0	33.0	34.0	38.0	40.0	55.0	38.0	
C-13	12.0	20.0	19.0	20.0	18.0	15.0	19.0	17.0	12.0	

Número normal de Leucocitos en ratón 9- 11 ($\times 10^3$) / mm^3

ND= No se determinó

(84)

3

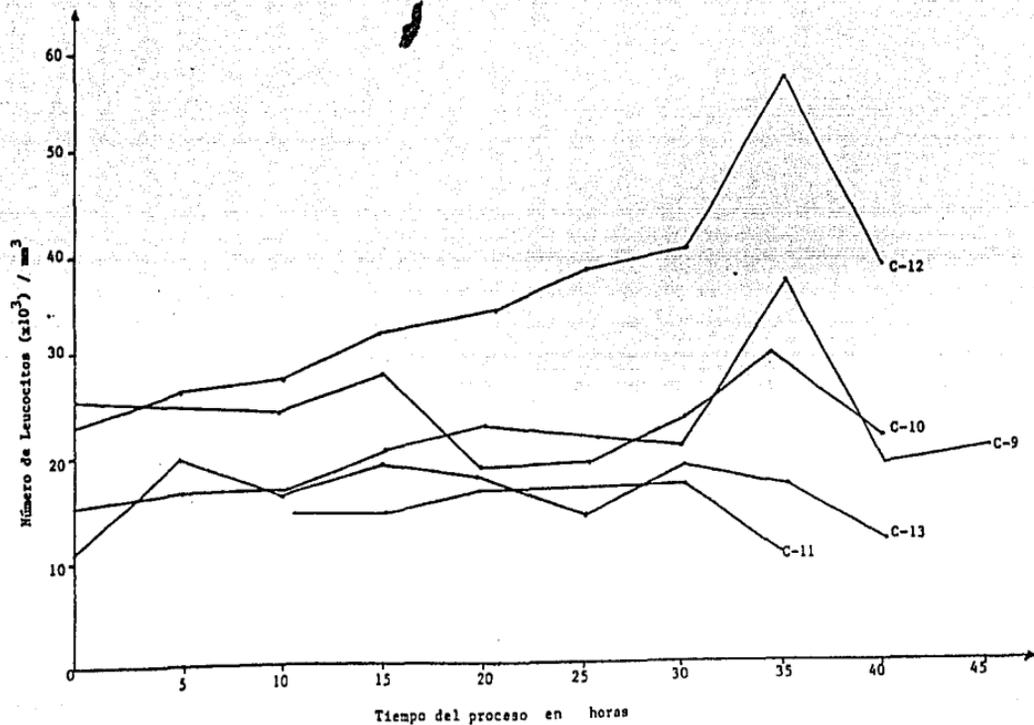


Figura 20 Leucocitosis producida en ratón al quinto día, durante el proceso de producción de Vacuna pertussis con la Cepa 165

D. EFECTO DE AGENTES QUÍMICOS SOBRE LA DETOXIFICACION DE LA VACUNA PERTUSSIS

Con respecto a la detoxificación de vacuna pertussis celular por métodos químicos, se probaron varios agentes y se evaluó la actividad del factor promotor de leucocitosis (FPL), factor sensibilizante a la histamina (FSH), toxina dermonecrótica (TDN) y la prueba de toxicidad. Además, se probó el tratamiento térmico a 56°C por 30 minutos, para compararlo con los anteriores.

Los agentes químicos utilizados fueron el glutaraldehído a concentraciones de 0.25% y 0.5%, la acetona y la beta-propiolactona, que en la sección D de metodología se indica como fueron aplicadas.

La actividad de FPL fue mayor en la primera muestra tratada con beta-propiolactona presentando una leucocitosis máxima de 146.0×10^3 células/mm³ al quinto día, donde hubo hasta tres muertos, seguida por la acetona con 2 muertes y 83.0×10^3 células/mm³ de leucocitosis máxima, el tratamiento térmico tuvo su máximo a 64.0×10^3 células/mm³ con 1 muerto. Estos valores aunque menores a la muestra que no tuvo tratamiento, estuvieron muy por encima al de los testigos tratados con solución salina isotónica con valores de 10.0 a 12.0×10^3 células/mm³. El glutaraldehído mostró valores comparables a los testigos con una leucocitosis máxima de 17.0×10^3 células/mm³ a la menor concentración de 0.25% (tabla 13).

En la evaluación de la actividad de FSH las muestras tratadas con glutaraldehído a ambas concentraciones no mostrarán actividad del FSH ya que no hubo sensibilización a la histamina tal como sucede en el testigo negativo, que fue el diluyente usando para preparar las suspensiones. Le siguieron en este orden el tratamiento térmico, la acetona y la beta-propiolactona. Esta última tuvo los mismos resultados que las muestras sin tratamiento (tabla 14).

Para la prueba de toxicidad (tabla 15) y actividad de TDN (tabla 16), las únicas atóxicas fueron las tratadas con las dos concentraciones de glutaralde-

(87)

hído al igual que no presentaron actividad de TDN, las demás muestras tratadas con acetona, beta-propiolactona y tratamiento térmico, fueron tóxicas y presen taron actividad de TDN.

Tabla 13. Efecto de la detoxificación de agentes químicos sobre la Actividad de FPL, en un lote de Vacuna Pertussis.

Lote	Tratamiento	Número de Leucocitos $\times 10^3$ a diferentes días de Lectura.		
		0	5	7
D-1	Glutaraldehído 0.25%	10.0	13.0	17.0
	Glutaraldehído 0.5%	10.0	13.0	14.0
	Acetona	10.0	83.0*	80.0 (2+)
	B-Propiolactona	10.0	146.0 (3+)	90.0
	Térmico (56°C/30')	10.0	64.0	47.0 (1+)
	Sin tratamiento	10.0	237.0 (4+)	(1+)
Testigo	(Solución salina - isotónica)	10.0	11.0	12.0

* En el paréntesis se indica el número de ratones muertos en el tiempo indicado.

Tabla 14. Efecto de la detoxificación de agentes químicos sobre la actividad de FSH en un lote de Vacuna pertussis.

Lote	Tratamiento	Relación de muertos/número de ratas trabajadas.
D-1	Glutaraldehído 0.25X	0/5
	Glutaraldehído 0.5X	0/5
	Acetona	3/5
	B-Propiolactona	4/5
	Térmico (56°C/30')	1/5
	Sin tratamiento	4/5
Testigo	(-)	0/5
Testigo	(+)	5/5

El testigo negativo fue el diluyente (Sol. salina saturada) usada para preparar las suspensiones bacterianas.

El testigo positivo fue Bordetella pertussis viva.

Tabla 15. Efecto de la detoxificación de agentes químicos sobre la Prueba de Toxicidad aplicada a un Lote de Vacuna - pertussis.

Lote	Tratamiento	Resultado
D-1	Glutaraldehído 0.25%	Atóxico
	Glutaraldehído 0.5%	Atóxico
	Acetona	Tóxico
	B-Propiolactona	Tóxico
	Térmico (56°C/30')	Tóxico
	Sin tratamiento	Tóxico

Tabla 16. Efecto de la detoxificación de agentes químicos sobre la Actividad de TDM en un lote de Vacuna pertussis.

Lote	Tratamiento	Resultado
D-1	Glutaraldehído 0.25%	Negativo
	Glutaraldehído 0.5%	Negativo
	Acetona	Positivo
	B-Propiolactona	Positivo
	Térmico (56°C/30')	Positivo
	Sin tratamiento	Positivo
Testigo	negativo	Negativo
Testigo	positivo	Positivo

El Testigo negativo fue solución salina isotónica.

El Testigo positivo fue Bordetella pertussis viva.

DISCUSION

DISCUSION

La vacuna pertussis al igual que el agente etiológico de la tosferina, - Bordetella pertussis, presentan una serie de componentes con actividad biológica particular; en el caso de la vacuna esta actividad es reducida por el proceso de fabricación que al la vez elimina algunos componentes como la toxina dermonecrótica.

La actividad biológica se encuentra intimamente relacionada tanto en toxicidad como en protección, por lo cual si se elimina la toxicidad el producto no es eficaz en protección.

Por esta razón, en este trabajo se estudiaron algunos de los componentes y su relación para tratar de obtener información que permita conocer una forma más adecuada y fácil para evaluar la actividad de la vacuna, con respecto a las pruebas que actualmente se emplean para la valoración de este biológico como lo sugiere la OMS. (29)

Con respecto a la toxicidad, evaluada como la determinación de ganancia de peso, (prueba de Pittman y Cox.), que nos permite evaluar el grado de toxicidad pese a que se ve fuertemente influenciado por la variación que implica usar un sistema biológico, se determinó también la actividad de FPL en este trabajo, encontrándose que en los lotes atóxicos determinados por la prueba de Pittman, la actividad de este factor, cuando se midió en lotes individuales al quinto día de la prueba, mostró un incremento en el número de leucocitos entre $22 \text{ y } 77 \times 10^3 / \text{mm}^3$; mientras que en los lotes tóxicos la actividad varió entre $27 \text{ y } 100 \times 10^3 / \text{mm}^3$.

La prueba de toxicidad no sólo considera el incremento de peso, sino también el número de muertos; en muchos casos cuando no hubo muertos los valores de leucocitos fueron menores de $70 \times 10^3 / \text{mm}^3$, límite que se obtiene en la prueba

ba con producto atóxico, pero esta información sólo indica que si el peso y el número de muertes fueron considerados para evaluar toxicidad, la variación biológica del animal no permite hacer una relación directa con la actividad del FPL.

En valores cercanos a la detoxificación (60% de incremento de peso o más, con respecto a los testigos) la leucocitosis fue menor de $66 \times 10^3/\text{mm}^3$ (7 lotes) con límite entre 27 y $66 \times 10^3/\text{mm}^3$, mientras que si el incremento de peso fue entre 30 y menor de 50%, los valores de leucocitos variaron entre 44 y $107 \times 10^3/\text{mm}^3$ y cuando el incremento de peso fue menor de 30% los valores fueron entre 52 y $100 \times 10^3/\text{mm}^3$. Como se puede observar con los datos anteriores, el límite inferior de leucocitosis en cada caso se incrementó al reducirse la ganancia de peso, es decir, cuando la muestra fue más tóxica y las respuestas estuvieron intercaladas en función del aumento de peso.

Si consideramos el número de muertes, tampoco se observa una relación directa. Lo anterior es debido probablemente a la variación de la prueba por el sistema biológico utilizado, ya que cuando se probaron muestras diferentes (Tabla 3) provenientes del mismo lote de producción, se observa que en uno de ellos el G 1 es tóxico mientras que G 2 y G 3 son atóxicos debido a la muerte del 10% de los animales (solo se permite el 5% de mortalidad). Y si se analiza la leucocitosis al quinto día, se observaron valores menores a los lotes atóxicos. esto confirma la hipótesis señalada, pero no se pudo reproducir para obtener una relación entre toxicidad y actividad de FPL en las otras muestras.

Otra posibilidad de reducir la actividad biológica de una preparación es el número de células de un biológico, por ello en este trabajo se estudió el efecto de la concentración celular sobre la actividad citada. La mayoría de las vacunas que se usan actualmente son de células completas inactivadas, de ahí la importancia de estudiar la concentración celular en una vacuna y el

efecto que va a tener, en este caso sobre el factor promotor de leucocitosis como unidad de medida de la respuesta.

En la práctica, las suspensiones de B.pertussis para hacer vacunas son usualmente almacenadas en forma concentrada y el factor de dilución adecuado es calculado por medición de la opacidad de esta suspensión, de esta manera conocemos indirectamente el número de células contenidas originalmente.

De acuerdo a los resultados estudiados en la tabla 6, 7 y 8 podemos observar que la leucocitosis producida es función de la concentración celular, a mayor concentración celular mayor leucocitosis, tal es el caso de B-1, B-2, B-4, B-5, B-7, B-9 y B-11. este efecto por el contrario, en B-8 y B-10 no se observando valores muy cercanos entre si en las diferentes concentraciones; en cambio en B-6 y B-3 se observan variaciones muy marcadas en cada valor. Esto nos da la pauta para considerar la intervención de otros factores presentes en la bacteria que influyen en la respuesta del ratón.

Con todo lo anteriormente descrito podemos señalar que si hay un aumento considerable (superior de $60.0 \times 10^3 \text{ cel/mm}^3$) en el número de leucocitos, lo que implica toxicidad y que la leucocitosis en función de la concentración celular es una relación directa, entonces si disminuye la concentración celular, disminuye la toxicidad. Por lo tanto, la evaluación de FPL puede ser considerada como índice de toxicidad, ya que la leucocitosis nos ayuda a medir la toxicidad basada en el FPL.

Así mismo observamos que un aumento considerable en el número de leucocitos como en B-4 a concentraciones celulares de 11, 12 y 13 UOP y B-7 de 12 y 13 UOP presentaron muertes, y los sobrevivientes marcaron valores superiores a $80.0 \times 10^3 \text{ cel/mm}^3$ al quinto día, y un estado físico crítico que implicaba una muerte inminente.

En el caso de B-5 en donde se presentaron muertos a 8,9 y 13 UOP se sugie-

re como causa de la muerte otras actividades biológicas debidas a factores presentes en la bacteria diferentes al FPL.

Unido a lo anterior podemos afirmar que cuando hay valores menores a 50.0×10^3 leuc/mm³ la probabilidad de que se presenten muertes es mínima.

El comportamiento que siguieron los valores de leucocitos al tercer, quinto y séptimo día después de la inoculación de la muestra fue el esperado, observamos un efecto claro de la actividad del FPL en el ratón, aumento en el número de leucocitos (comparado con el valor normal determinado de 9.0 a 11.0×10^3 - leuc./mm³) al tercer día, alcanzado una leucocitosis máxima al quinto día para finalmente disminuir al séptimo a valores cercanos o menores a los obtenidos al tercer día; efecto claro que observamos en las figuras 6 y 11.

Como se sabe, algunas de las células obtenidas a lo largo de la fermentación sufren lisis, lo cual implica la liberación del contenido intracelular al medio en que se encontraban suspendidas las bacterias, explicando esto el aumento en la actividad biológica presente normalmente. Si suponemos que el punto máximo de lisis se alcanza antes de inocular la muestra, se podría esperar que algunas de las muestras (B-2, B-5 y B-10) alcanzaron su punto máximo de leucocitosis al tercer día en lugar de al quinto día. Este comportamiento puede observarse en las figuras 7 (B-2) y 9 (B-5).

En el caso opuesto, en donde la posible lisis celular es gradual y por lo tanto la actividad aumenta igual, el valor de leucocitosis continuaría aumentando inclusive al séptimo día, como fue el caso de B-8 (único). Por lo tanto, la probabilidad de que esto suceda es muy baja.

Dada la relación de las UOP y la actividad de FPL, y ya que el FPL es un antígeno, se sugiere la elaboración de una vacuna con menor número de células que hayan sido enriquecidas con sobrenadante de cultivos tóxicos previamente de toxicados con tratamientos físicos o químicos de tal forma que no presenten -

toxicidad y conserven una actividad protectora. Es por esto que en cultivos con centrados no se recomienda eliminar el sobrenadante al diluir o concentrar una muestra, ya que en éste está descrita la presencia de actividad biológica como lo indican los estudios de Morse (25) quien demostró que en dicho sobrenadante había actividad de FPL y FSH; Sato y Arai (38) purificarón y caracterizarón al FPL obtenido de él y demostraron sus propiedades biológicas (39) y su relación con el antígeno protector; También Lehrer (18) obtuvo preparaciones altamente purificadas de FSH a partir del sobrenadante, preparación que mostró actividad de FPL y del efecto adyuvante, lo que sugirió que estas actividades puedan deberse a una sola especie molecular.

El uso de diferentes cepas influye de sobremanera en el FPL, pues mientras que con la cepa 134 se alcanzaron valores de leucocitos hasta de $110.0 \times 10^3 / \text{mm}^3$ (B-4) y $115.0 \times 10^3 / \text{mm}^3$ (B-7) y para la cepa 509 valores de $126.0 \times 10^3 / \text{mm}^3$ (B-11)(figura 12), en la cepa 165 no se obtuvieron valores tan altos, superiores a los $57.0 \times 10^3 / \text{mm}^3$ incluyendo a la concentración de 13 UOP, como en B-1 (figura 6), B-2 (figura 7) y B-3.

Mientras que para la cepa 165 las variaciones en los valores fueron muy cercanas y la respuesta un tanto desigual a las diferentes concentraciones, en la cepa 134 se observaron variaciones muy marcadas en los valores, aunque la respuesta tuvo el mismo comportamiento (salvo a 7 UOP).

Así mismo, en la cepa 509 se observó un efecto similar pero las variaciones fueron menores que en la cepa 134 (salvo a 7 UOP), por lo tanto podemos decir que las respuestas de las cepas 134 y 509 parecen ser la misma aunque los valores entre muestras, varían considerablemente, mientras que en la cepa 165 se esperan variaciones mínimas pero con respuestas muy irregulares lo cual nos indica poca consistencia en la reproducción en los datos obtenidos con esta cepa; podemos observar lo anterior en las figuras de la 13 a la 17.

De acuerdo a lo anterior podemos mencionar que una de las cepas que ofrece grandes perspectivas es la 165, debido a sus mínimas variaciones (en cuanto a FPL se refiere) y su baja toxicidad, aunque todavía se requiere profundizar más en cuanto al estudio de otros aspectos sobre la cinética de crecimiento para limitar variaciones entre cada una de las muestras.

Siendo la respuesta diferente entre las tres cepas, se puede observar que la primera presenta mayor actividad biológica (con respecto a FPL) es la cepa - 134, seguida por la 509 y en menor proporción la 165.

Con los estudios de concentración celular y de toxicidad anteriormente citados, se demostró la presencia y actividad biológica del FPL en vacunas pertussis al final de la fermentación; y también se intentó, en este trabajo, evaluar esta actividad a lo largo del proceso de producción en que se analizó este factor cada 4 y 5 horas.

En cuanto a la actividad de FPL no se observó mucha diferencia en los valores obtenidos para cada una de las cepas trabajadas y sólo hubo una excepción - para un lote de cepa 509 evaluado, que es el que mostró mayor actividad de FPL. Por lo que respecta a la respuesta de los animales a una inyección de vacuna - pertussis, mostraron una elevación al tercer día, con una máxima leucocitosis - al quinto día (excepto la cepa 134 que la presentó al tercer día en algunos casos y en otros al quinto día), y una paulatina disminución al séptimo día.

El tiempo de proceso en donde se observó una mayor actividad de FPL, agrupando a las tres cepas, estuvo en un límite de 10 a 35 horas.

Se sugiere por tanto, un estudio más amplio de la cinética de producción - para determinar el tiempo más adecuado donde existe la actividad de FPL deseada y la manera en que es conveniente trabajarlo para estar seguros que se muestra la máxima actividad.

Es conveniente modificar el sistema de evaluación en la cinética de produc

ción para obtener resultados más confiables que permitan una respuesta más consistente de esta actividad y que pueda evaluarse más finamente.

Con el objeto de incrementar la producción de la vacuna, Jagicza y col. - (16) estudiaron las condiciones de cultivo y lograrón tener una vacuna inocua, potente y estable; esto mismo se sugiere para este proceso, una preparación de lote semilla con modificaciones a la formulación del medio para obtener una vacuna más adecuada y donde la actividad del FPL sea evaluada con mayor consistencia, y pueda determinarse el tiempo idóneo para detener el proceso de fermentación, en donde se obtenga un cultivo con los inmunógenos necesarios que deben estar presentes en la vacuna, que no sea tóxico y que conserve su actividad protectora.

Después del proceso de fermentación es necesario un tratamiento que elimine la toxicidad propia de los factores de Bordetella pertussis y nos proporcione a la vacuna como tal.

El método más usado, sugerido por la OMS (29), y el cual se utiliza en México para la producción de esta vacuna, es el tratamiento térmico a 56°C por 30 minutos. Este tratamiento no ha sido el ideal ya que a veces con un sólo calentamiento no se logra eliminar esta actividad tóxica y son necesarios hasta dos o tres calentamientos adicionales, con lo cual puede verse afectada la actividad protectora de la vacuna.

Se han usado varios métodos además del calentamiento, como son diferentes incubaciones, largos períodos de almacenamiento de +2 a +8°C tratamientos con formalina o con timerosal o alguna combinación de estos métodos (35). Otros autores han utilizado acetona, glutaraldehído, formaldehído y timerosal individualmente (37, 11, 15, 10) y para la vacuna acelular se han usado el formol (41) y el glutaraldehído (35).

En el presente trabajo se estudió la detoxificación por los agentes quími

cos siguientes: glutaraldehído al 0.25% y 0.5%, acetona y beta-propiolactona así como por tratamiento térmico.

La eficacia de estos agentes para detoxificar, se evaluó por el grado de toxicidad dado por la actividad de la toxina dermonecrótica (TDN), factor promotor de leucocitosis (FPL), factor sensibilizante de histamina (FSH) y por la prueba de toxicidad.

El glutaraldehído a ambas concentraciones mostró se el único capaz de reducir las actividades de TDN, FSH, eliminó la leucocitosis de la preparación hasta llegar a valores basales (determinados entre 9 y 11×10^3 leuc/mm³ y consiguió una vacuna atóxica en la prueba de toxicidad. Los demás agentes no lograron eliminar el FSH y TDN, fueron tóxicos en la prueba de toxicidad y mostraron una leucocitosis marcada.

La vacuna, por lo tanto, puede ser obtenida por tratamiento con glutaraldehído, sin embargo se requieren otros estudios para lograr conocer su efecto sobre la potencia.

Como se puede observar en los resultados obtenidos en este trabajo es difícil tener reproducibilidad entre la actividad de FPL en diferentes lotes y cepas vacunales, ya que es sabido que los mismos componentes con actividad tóxica tienen actividad protectora (20).

La primera vacuna acelular se utilizó en Japón y fué obtenida por Sato, Kimura y Fukumi (41). En México García Sainz y colaboradores (9) obtuvieron una preparación del sobrenadante de la vacuna pertussis celular y se demostró su actividad protectora. Estos estudios tratan de "mejorar" la relación de la actividad tóxica y la protección.

Así se ha llegado a la obtención de una vacuna pertussis de tercera generación teniendo como principal componente a la toxina pertussis que una vez producida requiere tratamiento para detoxificación.

(101)

En el caso de las vacunas celulares, debido a la variabilidad antigénica de las cepas de producción es conveniente utilizar un sistema que permita detectarlos, y esto podría ser el estudiar las proteínas de membrana externa de las cepas vacunales desde el inicio hasta el final del proceso, ya que hay hipótesis que sugieren que el contenido de estas proteínas influye en la toxicidad y protección de las vacunas que se obtienen (3,4,42).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- No se logró determinar experimentalmente una relación entre la prueba de toxicidad y la actividad de FPL, en diferentes lotes más se pudo constatar que el uso de la prueba de FPL puede ser un auxiliar para evaluar la toxicidad de una vacuna pertussis celular.
- Midiendo la actividad de FPL en lotes con diferentes muestras, si se obtiene una relación con respecto al número de leucocitos inducidos, pero comparado con la prueba de toxicidad aún siendo la misma muestra, no es igual el efecto.
- La evaluación de la toxicidad midiendo la actividad de FPL, resultó ser un método más preciso que el de la prueba de toxicidad actualmente utilizada, ya que esta última se ve influenciada por la variación que implica el usar un sistema biológico en la prueba.
- Se encuentra una relación directa entre la concentración celular de la vacuna y la actividad biológica del FPL.
- La actividad de FPL varía entre las cepas 134, 509 y 165 siendo más activa en la cepa 134.
- La cepa 165 es una cepa promisoría para la producción de vacuna pertussis en lugar de las cepas 134 y 509, actualmente utilizadas, ya que tiene menor actividad de FPL, lo cual está relacionado con la actividad protectora.
- La evaluación del FPL durante el proceso de producción no muestra en que etapa se encuentra la máxima actividad.
- Se sugiere utilizar parámetros adicionales, además del FPL, para estudiar la cinética de producción de la vacuna.

(104)

- Es promisorio el uso de agentes químicos para detoxificación de la vacuna - pertussis celular, siendo el glutaraldehído el mejor agente en comparación con el tratamiento térmico.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Andersen, E.K. 1969. A Comparison of two Challenge Strains for Pertussis - Protection Test. International Symposium on Pertussis, Bilthen; Symp. Series Immunobiol. Stand 13: 115 - 120.
2. Arai, H. and Sato Y. 1976. Separation and Characterization of two Distinct Hemagglutinins Contained in Purified Leukocytosis Promoting Factor from Bordetella pertussis. Biochemia et Biophysica Acta. 444: 765-782
3. Armstrong, S.K. and Parker C.D. 1986. Surface proteins of Bordetella pertussis: Comparison of Virulent and Avirulent Strains and effects of Phenotypic Modulation. Infection and Immunity. 54 (2): 308-314
4. Armstrong, S.K. and Parker C.D. 1986. Heat-modifiable Envelope Proteins of Bordetella pertussis. Infection and Immunity. 54 (1): 109-117
5. Buchanan, R.E. and M.E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eight Edition. pp. 282-283. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
6. Cameron, J. 1976. Problems associated with the Control Testing of Pertussis Vaccine. Advances in Applied Microbiology. 20 : 57-80
7. Cameron, P. Rousseau, P. and Trepanier, G. 1985. Bordetella pertussis: Growth in stainless steel. J. Biol. Stand. 13 : 97-100
8. Cowell, J.L., Hewlett, E.L. and Manclarck, C.R. 1979. Intracellular localization of the Dermonecrotic Toxin of Bordetella pertussis. Infection and Immunity. 25 (3) : 896-901
9. Garcia Sainz, J.A., Ruiz Puente, J., Jimenez, J., Gonzalez Pacheco, M. y Villalva Posada, H. 1985. Comparative Biological Activities of Whole Cell-Pertussis Vaccine and a New Acellular Preparation. Vaccine. 3 : 23-26

10. Gupta, R.K., Sharma, S.B., Abuja, S. and Saxena, S.N. 1987. Glutaraldehyde Inactivated Pertussis Vaccine: a less histamine sensitizing vaccine. - Journal of Biological Standardization. 15 : 159-164
11. Gupta, R.K., Sunitti B.S., Subbashi, A. and Saxena, S.N. 1987. The Effect of Different Inactivating agents on the Potency, Toxicity and Stability of Pertussis Vaccine. Journal of Biological Standardization. 15 : 85-98
12. Hasley, N. and Galazka, A. 1985. The efficacy of DPT and Oral Poliomyelitis Immunization Schedules Intrated from Birth to 12 weeks of age. Bulletin of the World Health Organization. 63 (6): 1151-1169
13. Hewlett, E. Actividades Biológicas de Bordetella pertussis y los efectos de ella en tosferina. Conferencia impartida en el INH.
14. Ho May-Kin, Kong, S. and Morse, S.I. 1980. The in vitro Effects of Bordetella pertussis Lymphocytosis Promoting Factor on Murine Lymphocytes V. - Modulation of T cell Proliferation by Helper and suppressor Lymphocytes J. Immunol. 124 (1): 362-369
15. Iida, T. and Y. Horiuchi 1987. The Detoxification of Bordetella pertussis with glutaraldehyde. Journal of Biological Standardization. 15: 17-26
16. Jagicza, A., Balle, P., Lendvay, N., Zsidai, J. and Erdei, S. 1985 Production of Active vaccine by large Scale Continuous Fermentation of Bordetella pertussis. Ann. Immunol. Hung 25 : 17-21
17. Lehrer, S.B. 1978. Investigation of the Biological Activities of the Histamine Sensitizing Factor of Bordetella pertussis third International Symposium on pertussis part 3 v.s. Depart of Health Education and Welfare Public Health Service NIH Bethesda. Nov: 160-165

18. Lehrer, S.B., E.M. Tan and J.H. Vaughan 1974. Extraction and Partial Purification of the Histamine Sensitizing Factor of Bordetella pertussis. The Journal of Immunology 113 (1) : 18-26
19. Manclark, C.R. 1981. Pertussis Vaccine Research Bulletin of The World Health Organization. 59 (1): 9-15
20. Manclark, C.R. and D.L. Burns 1985. Prospects for a New Pertussis Vaccine Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol.
21. Manclark, C.R., Urban, M.A., Summers, E.P. and Vickers, J.H. 1977. Assay of Pertussis Vaccine Toxicity by Rat-Paw-Oedema. Method. J. Med. Microbiol. 10 :
22. Meade, B.D., Kind, P.D. and Manclark, C.R. 1984. Lymphocytosis Promoting Factor of Bordetella pertussis Alters Mononuclear Phagocyte Circulation and Response to Inflammation. Infection and Immunity. Dec. 46 (3):733-739
23. Miller, D.L. Aldersold, R. and Rose, E.M. 1982. Whooping Cough and Whooping Cough Vaccine: The Risk and Benefits Debate. Epidemiological Reviews 4 : 1-24.
24. Morse, S.I. 1976. Biologically Active Components and Properties of Bordetella pertussis. Advances in Applied Microbiology 20 : 9-26
25. Morse, S.I. and Bray, K.K. 1969. The Occurrence and Properties of Leukocytosis and Lymphocytosis Stimulating Material in the Supernatant Fluids of Bordetella pertussis. J. Exp. Med. 129 : 523-550
26. Morse, S.I. and Morse, J.H. 1976. Isolation and Properties of Leukocytosis and Lymphocytosis Stimulating Material in the Supernatant Fluids of Bordetella pertussis. J. Exp. Med. 101: 223-230

27. Muñoz, J. and Bergman, R.K. 1968. Histamine Sensitizing Factor from Microbial Agents with Special Reference to Bordetella pertussis. Pathol. Rev.-32 (2): 103-126
28. Oda, M., Cowell, J.L., Burstyn, D.G. and Manclarck, C.R. 1984. Protective Activities of Filamentous Hemagglutinin and the Lymphocytosis Promoting - Factor of Bordetella pertussis in mice. Journal of Infectious Diseases. -150 (6): 823-833
29. Organización Mundial de la Salud 1984. Normas para la vacuna anti-pertu - ssis. Serie de informes técnicos No. 274
30. Organizacion Mundial de la Salud 1985. Developments in pertussis vaccine: Memorandum from a WHO meeting Bulletin of The World Health Organization.-63 (2): 241-248
31. Organizacion Mundail de la Salud. 1985. Development of Acellular Pertu - ssis Vaccine. Bulletin of the World Health Organization. 63 (6): 993-994
32. Pittman, M. 1970. Bordetella pertussis. Bacterias and Host Factors in the Pathogenesis and Prevention of Whooping Cough. In Stuart Mudd. Infections Agents and Hosts Reactions Published by W.B. Saunders Company. Philadel - phia. p. 239-251
33. Pittman, M. and Wardl, A.C. 1981. The Genus Bordetella. A handbook on Ha - bitants Isolation and Identification of Bacteria. Springerlang, Berlin - p. 1075-1085
34. Preston, N.W. 1970. Technical problem in the Laboratory Diagnosis and Pre - vention of Whooping Cough. report from Lab. Practice. 19 (5): 422-486
35. Relyveld, E.H. 1973. Preparation of Vaccins antitoxiques et antimicro - biens a / aide du glutaldehyde C.R. acad. Sci. Paris, Ser. D. 277:613-616

36. Rufz puente, J. Exámen predoctoral. escuela Nacional de Ciencias Biológi - cas. I.P.N. 1987.
37. Sarah, G. 1985. Acetone-Treated pertussis Vaccine. A potent and Safer New pertussis Vaccine. Journal of Biological Standarization 13 : 315-320
38. Sato, Y., Arai, H. and Suzuki, K. 1973. Leukocytosis Promoting Factor of - Bordetella pertussis . I. purification an Characterizacion Infection and - Immunity. 6 (6): 899-904
39. Sato, Y. and Arai, H. and Suzuki, K. 1973. Leukocytosis Promoting Factor - of Bordetella pertussis. II. Biological Propierties. Infection and Immuni - ty Z(6) : 992-999
40. Sato, Y., Arai H. and Suzuki, 1974. Leukocytosis Promoting Factor of Borde - tella pertussis. III. It's Identity with Protective Antigen. Infection and Immunity. 9 (5) : 801-810
41. Sato, Y.K., Izumiya, H., sato, J.L., Cowell, J.L. and Manclarck, C.R. 1981 Role of antibody to Leukocytosis Promoting Factor Hemagglutinin in Immuni - ty 31 (3): 1223-1231.
42. Sharek, F. and J. Cameron 1984. Cloning of Bordetella pertussis outer mem - brance proteins in Escherichia coli. Journal of Bacteriology. 159 (2) : - 780-782.
43. Stainer, D.W. and Scholte, J.L. 1970. A simple Chemically Defined Medium - for the production of phase I. Bordetella pertussis. Journal of General Mi - crobiology. 63: 211-220
44. Weiss, A.A. and Hewlett, E.L. 1986. factor of Bordetella pertussis. Ann. - Rev. Microbiol. 40 : 661-686