

Ensayos para evaluar la toxicidad de la toxina pertúsica en vacunas acelulares

Susana Miraidys Brito-Molina

Departamento de Bioquímica, Dirección Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, La Habana, Cuba.
susana.brito@cnic.edu.cu

Recibido: 18 de febrero de 2014.

Aceptado: 9 de julio de 2014.

Palabras clave: *sensibilización a histamina, células CHO, vacunas acelulares, toxina pertúsica.*

Key words: *Bordetella pertussis, whooping cough, adenylate cyclase, hemolysin.*

RESUMEN. La toxina pertúsica es el principal factor de virulencia producido por *Bordetella pertussis* y su forma detoxificada, es un importante componente de las vacunas contra la tosferina. El ensayo in vivo de sensibilización a histamina en la actualidad es el método recomendado por la Organización Mundial de la Salud para las pruebas de seguridad de la vacuna. Existen dos maneras de determinar la sensibilización a histamina en ratones: 1) por reducción de la temperatura corporal o 2) por seguimiento de la mortalidad. Sin embargo, se han desarrollado métodos alternativos al de la sensibilización a histamina, ya que este ensayo utiliza un gran número de animales y a menudo, conduce a repetidas pruebas debido a la variabilidad de los resultados. Algunos de los ensayos in vitro son: 1) el ensayo con células de ovario de hámster chino, 2) la combinación del ensayo de actividad enzimática acoplado a cromatografía líquida de alta resolución con el método de unión a carbohidratos y 3) ensayos genéticos. El objetivo de este trabajo consistió en realizar un análisis de los métodos in vivo e in vitro que se utilizan para evaluar la toxicidad de la toxina pertúsica en vacunas acelulares. No existe un protocolo estandarizado de los ensayos in vitro que permita utilizarlos en las pruebas de validación de las vacunas, por lo que es necesario continuar la búsqueda de una alternativa al método de sensibilización a histamina, para evitar la utilización de animales en estos ensayos.

ABSTRACT. Pertussis toxin is a major virulence factor produced by *Bordetella pertussis* and, in its detoxified form is an important component of pertussis vaccines. The histamine sensitization test is currently the method recommended by the World Health Organization for testing the vaccine safety. There are two ways for determining the sensitization to histamine in mice: 1) by corporal temperature reduction or 2) by the lethal end point. However, alternative methods to histamine test have been developed, as this assay uses a large number of animals and often leads to repeated tests due to the high variability of the results. Some of the in vitro tests are: 1) Chinese hamster ovary cells assay, 2) the combination of enzyme coupled-high performance liquid chromatography with carbohydrate-binding assays and 3) genomic assay. The aim of this work was to analyze the in vivo and in vitro methods used to assess the toxicity of pertussis toxin in acellular vaccines. There is no standardized protocol in vitro assays that allow use in the vaccine validation tests, so it is necessary to still looking for an alternative histamine sensitization method to evaluate the toxicity of the pertussis toxin in acellular vaccines, to avoid the use of animals for testing.

INTRODUCCIÓN

La tosferina o pertussis es una enfermedad aguda que afecta el tracto respiratorio en humanos y otros mamíferos relacionados con el hombre. Es provocada fundamentalmente por la bacteria Gram negativa *Bordetella pertussis* y en menor medida por *Bordetella parapertussis*, siendo la población infantil la más vulnerable.¹⁻³ La vacunación contra la tosferina es clave en las campañas de inmunización a escala global en la prevención de la enfermedad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la vacunación con dos tipos de vacunas, las de células completas (VCCs) y las acelulares (VAC).⁴ Históricamente, las VCC han tenido un desempeño principal en el control de la enfermedad y son aún la única opción para la mayor parte de la población mundial. Por lo general, se considera que las VAC son menos reactogénicas que las VCC y existe una tendencia incrementada a reemplazar estas por aquellas. La toxina pertúsica detoxificada (TPd) constituye uno de los principales componentes empleados en la producción de las VAC para la prevención de la tosferina. La toxina pertúsica (TP) cumple el papel principal en la patogénesis de la tosferina y es el principal antígeno inductor de protección inmunológica contra *B. pertussis*.^{6,7} La producción de la TPd tiene que ser cuidadosamente controlada para evitar la pérdida de inmunogenicidad, así como, que ocurra reversión de la toxicidad.⁸ La evaluación de la toxicidad residual de la TPd y su reversión, es esencial para la evaluación de la seguridad de las vacunas y es requerido por las agencias regulatorias.^{2,5} Existen diferentes métodos para determinar la actividad de la TP, aunque el único aprobado por la OMS para evaluar el producto final es el ensayo de sensibilización a histamina.⁹ Existen dos variantes para determinar la sensibilidad a histamina, una mediante el seguimiento de la mortalidad y la otra, por medición de la temperatura corporal, ya sea dérmica o rectal.¹⁰ La variante más sensible es la medición de temperatura corporal,⁵ sin embargo en la actualidad se buscan alternativas del ensayo de sensibilización a histamina debido al número significativo de animales que se utilizan para llevar a cabo estos ensayos.¹¹

Se han desarrollado diferentes métodos *in vitro* con el fin de disminuir el número de ratones y las molestias que se les ocasiona en los ensayos de sensibilización de histamina. Algunos de los métodos desarrollados son: el ensayo con células de ovario de hámster chino (CHO), ensayos genéticos y la combinación del ensayo de actividad enzimática acoplado a cromatografía líquida de alta resolución (E-HPLC) con el ensayo de unión a carbohidratos.¹² El presente trabajo tuvo como objetivo realizar un análisis de los métodos *in vivo* e *in vitro* que se utilizan para evaluar la toxicidad de la TP en vacunas acelulares.

VACUNAS ACELULARES CONTRA LA TOSFERINA

Las vacunas acelulares por definición son una preparación libre de células.¹³ En la década del 70, se determinó que la TP, la hemaglutinina filamentosa (FHA) y los lipopolisacáridos (LPS) eran liberados en el medio líquido durante el cultivo.¹⁴ Estos antígenos podían ser separados mediante centrifugación por gradiente de densidad, aunque había un conocimiento limitado en este tiempo sobre la función e importancia de varios antígenos de *B. pertussis*. Como resultado, se determinó que la TP era el antígeno más importante en el diseño de las vacunas acelulares y que los LPS debían ser excluidos, ya que eran la causa fundamental de las reacciones adversas.^{15,16} Sato y col. en Japón en 1984, fueron los primeros en describir la producción de un componente acelular de *B. pertussis* para vacunas, la cual contenía estos componentes en cantidades definidas.^{15,17} La tecnología consistió en la centrifugación de los cultivos y la concentración de los sobrenadantes que contenían TP, FHA y otros antígenos, incluyendo LPS. Los LPS fueron eliminados luego de la ultracentrifugación y la TP detoxificada con formalina.¹⁵ Debido a la epidemia de tosferina que ocurrió en Japón en 1981, estas vacunas fueron utilizadas inmediatamente sin haber realizado estudios de eficacia, inmunogenicidad y reactogenicidad. Sin embargo, la situación epidémica de la tosferina en este país fue significativamente controlada con estas vacunas. Debido a la falta de información adecuada sobre las vacunas japonesas, la primera generación de ellas se limitó a este

país.¹⁸ Los éxitos de la vacuna combinada (DTaP) contra difteria, tétano y pertussis fueron un estímulo para posteriores estudios y ensayos en Japón, Estados Unidos, Europa y África.¹⁹ Las vacunas acelulares son claramente menos reactogénicas que las vacunas de células completas, lo cual se asume que ocurre debido a la disminución o eliminación total de la actividad de la TP y a la significativa reducción de las cantidades de LPS presentes.²⁰

Una tendencia universal en el empleo de las vacunas contra pertussis ha sido la sustitución paulatina de las VCC por las VAC.²¹ Históricamente, las VACs han sido preparadas por una fracción de sobrenadante de cultivo o material liberado por la ruptura o extracción química de las células de *B. pertussis*.¹³ Las vacunas DTaP actuales son de un solo componente (toxoides TPd), de dos componentes: TPd y FHA, tres componentes: TPd, FHA y pertactina (PRN), cuatro componentes: TPd, FHA, PRN y fimbria 2 (FIM2), y de cinco componentes (TP, FHA, PRN, FIM2 y FIM3).^{1,22} Existen diferentes métodos de detoxificación de la TP, los cuales incluyen tratamientos con formaldehído, glutaraldehído, formaldehído más glutaraldehído, peróxido de hidrógeno, o detoxificación genética.^{8,23} El principio activo de las vacunas acelulares es usualmente adsorbido por hidróxido de aluminio o gel fosfato antes de unirlo al resto de los componentes, para la formulación final.⁹ Debido a las diferencias que existen en el proceso de producción de la TPd, las vacunas acelulares no tienen definido completamente una composición química, incluso la TP modificada genéticamente tiene un tratamiento con bajas concentraciones de formaldehído, para estabilizar la molécula.²⁴ Por ello, las pruebas de seguridad están dirigidas hacia el monitoreo de componentes específicos, especialmente, de la TP.^{9,25}

TOXINA PERTÚSICA

La TP es una proteína de 105 kDa con actividad disfosfato de adenosina (ADP)-ribosiltransferasa que es sintetizada y secretada exclusivamente por *B. pertussis*. Es una toxina tipo A-B compuesta por seis polipéptidos, designados desde S1 a S5.¹ La TP es secretada al medio extracelular y una vez dentro de la célula eucariota, la subunidad B se intercala en la membrana citoplasmática y une ATP, lo cual provoca la liberación de la subunidad activa S1.²⁶ La subunidad catalíticamente activa es S1 y es activada mediante la reducción de sus puentes disulfuro.²⁷

Estudios en modelos animales han demostrado que la TP causa síntomas sistémicos como linfocitosis, insulinemia o hipoglicemia, sensibilidad a la histamina y disminuye el reclutamiento de neutrófilos.²⁸ También se ha observado que la TP inhibe la quimiotaxis *in vivo* de macrófagos, e *in vitro* de neutrófilos y linfocitos mediante la alteración de las concentraciones de Ca^{2+} . Además, activa la secreción de IL-1 β en macrófagos, la cual puede afectar funciones neuroendocrinas,^{29,30} así como inducir la proliferación de células T secretoras de IL-2 e IFN- γ .³¹ A su vez, presenta actividad inmunosupresora.²⁹ Se sugiere que funciona como una adhesina involucrada en la unión de *B. pertussis* a macrófagos y a las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio.³² Se ha visto también, que la TP entra a las células y cataliza la transferencia de (ADP)-ribosa a diferentes proteínas G, lo que altera eventos de transducción mediados por una serie de receptores acoplados a la proteína G.³³ Existe evidencia de que la TP (a través de su actividad ADP-ribosiltransferasa) contribuye de manera significativa en los eventos que ocurren en las vías respiratorias durante la infección con tosferina, como son: inhibición de la respuesta innata, exacerbación de la inflamación de las vías respiratorias, así como la modulación de los reflejos de la tos.¹¹ La mayoría de los síntomas típicos de la tosferina están asociados al amplio espectro de actividad biológica de la TP.^{34,35}

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

Ensayos de toxicidad *in vivo*

Las VAC actuales contienen TPd como componente principal. Un aspecto esencial en su evaluación de seguridad exigido por las agencias regulatorias de medicamentos es el monitoreo del contenido de TP activa y el chequeo de la reversión de su toxicidad.^{21,36} El ensayo de

sensibilización a histamina en ratones es el método oficial recomendado por la OMS para la evaluación de la toxicidad de las VAC.⁵ Actualmente, se utilizan dos métodos de sensibilización a histamina para la determinación de TP residual en vacunas acelulares. Uno es basado en el seguimiento de la mortalidad y el otro, en la medición de la reducción de temperatura (dérmica o rectal) después de la exposición a histamina.^{9,37,38}

En el método basado en el seguimiento de la mortalidad, un grupo de ratones son inyectados intraperitonealmente con diferentes dosis de la vacuna. Cuatro o cinco días después son inyectados con una dosis de una disolución de histamina y se registra el número de ratones muertos dentro de las 24 h después de la inyección con histamina.¹³ En este ensayo, se determina la proporción de animales que mueren al reto con histamina en ratones sensibilizados con la preparación en estudio y se realiza un registro de respuesta binaria de muerte o sobrevivencia. Una vez que se ha establecido la linealidad por repetidos experimentos, el ensayo puede ser simplificado a incluir en cada prueba una sola dosis del estándar de TP para garantizar la sensibilidad del ensayo.³⁸ En 1976, Ishida y cols. demostraron que este método era relativamente preciso y reproducible en la estimación y bastante sensible en las pruebas de validez de un ensayo biológico.³⁹ Sin embargo, a lo largo del tiempo en diferentes ensayos se ha visto que es difícil de estandarizar, debido a las variaciones en los resultados, incluso en un mismo laboratorio bajo las mismas condiciones.⁴⁰ Las especificaciones actuales para este ensayo del seguimiento de la mortalidad fueron establecidas inicialmente para las vacunas DTaP y no hay límite acordado internacionalmente en la actividad permitida para estos productos, sobre todo para las vacunas de múltiples componentes más complejas, tales como las combinaciones pentavalentes o hexavalentes.³⁸ La ausencia de límites acordados, las variaciones en la respuesta y la sensibilidad del ensayo, a menudo conducen a la repetición de las pruebas a resultados aparentemente contradictorios entre laboratorios.⁵

El método basado en la medición de la temperatura rectal es una variante más sensible que no requiere la muerte de los ratones para determinar la actividad residual de la TP, además, se puede evaluar cuantitativamente la actividad de la vacuna en comparación con la del estándar, de manera tal que se puede expresar en unidades de sensibilización a histamina (USH).^{41,42} Cuatro días después de que los ratones son inyectados con la vacuna a evaluar, se le administra de forma intraperitoneal una disolución de histamina. La temperatura rectal se mide 30 min después de la inyección con histamina.³⁸ La respuesta de la temperatura se analiza mediante un método estadístico adecuado para dar una estimación de la actividad residual de la TP en la vacuna a evaluar, en relación con la preparación de referencia. El lote de la vacuna es aceptado, si la actividad residual de la TP estimada en el grupo prueba, no es mayor que el valor especificado por el convenio con la agencia nacional regulatoria. En la actualidad, existe un límite máximo acordado internacionalmente para la TP activa en las vacunas contra la tosferina. En algunos países, el límite superior requerido, es de 1,09 o 2,18 UI (0,2 o 0,4 USH) de PT por dosis de vacuna de DTaP.³⁸

Aunque el método de medición de la reducción de la temperatura es más sensible y cuantitativo que el seguimiento de la mortalidad,⁴³ los protocolos para ambos métodos son difíciles de estandarizar.¹³ Se ha observado y demostrado una gran variación en los resultados, ya que estos dependen de múltiples variables tales como: la cepa del ratón, el número, la edad y la vía de inyección.⁴⁴ Hokyung y cols. en 2012, trabajaron en el mejoramiento de los protocolos de sensibilización a histamina, y comprobaron que de una serie de modelos de ratón, la cepa que mostró mayor sensibilidad fue la CD1, además, se observó que los ratones machos eran más sensibles. Otro de los resultados de los experimentos realizados, es la obtención de mayor sensibilidad en el método de medición de la temperatura rectal cuando se administra 0.5 mg en lugar de 2 mg de histamina. Además, la adición de LPS en ambos protocolos refuerza la sensibilidad a histamina. Los investigadores sugirieron que los resultados eran útiles para mejorar los protocolos actuales y los controles de la calidad de las vacunas. Sugirieron además, continuar

mejorando y optimizando los protocolos de sensibilización de histamina con el fin de reducir el número de animales utilizados en estos ensayos.³⁷

En 2007 Ochiai y cols. desarrollaron una serie de experimentos con el objetivo de refinar el método de medición de la temperatura, para minimizar las molestias a los ratones. El método consistió en la medición de la temperatura dermal después de la exposición de los ratones a histamina, utilizando un termómetro infrarrojo.⁴⁵ Este método puede usarse para evaluar vacunas de combinaciones más complejas y puede ser transferible entre laboratorios. Además, la medición de la temperatura dérmica proporciona una estimación cuantitativa más precisa de la actividad de la toxina que la respuesta binaria que se obtiene en el método de seguimiento de la mortalidad. También permite reducir el número de animales que se utilizan en los ensayos.⁹

El límite de detección de este ensayo fue estimado por Jensen y cols. en 2012, el que resultó de 5 ng aproximadamente de TP por dosis humana de toxoide pertúsico. El ensayo basado en la medición de la temperatura dermal resultó un método válido para ser aplicado en el control rutinario de las vacunas antipertúsicas.⁴⁶ La medición de la temperatura dermal para cuantificar la actividad residual de la TPD es mucho más fiable, reproducible y requiere menos repeticiones que el método de sensibilización a histamina del punto final letal.⁴⁵

El desarrollo del método de medición de temperatura corporal, ya sea rectal o dermal ha permitido un refinamiento de la técnica, pues la temperatura se toma a los 30 min después de la inyección con histamina, sin embargo, en el punto final letal se espera 24 h después de la inyección con histamina. Por otro lado, el hecho de utilizar la reducción de la temperatura como criterio de valoración, evita la necesidad de llegar a la letalidad de los ratones.

Otro de los métodos *in vivo* que permite determinar la actividad de la TPD, es el conteo de leucocitos, el cual se basa en la comparación de la respuesta de un grupo de ratones inyectados con la vacuna a evaluar y otro grupo que es inyectado con una preparación de referencia. Al grupo control, solo se le inyecta una disolución salina. Tres o seis días después de la inyección, son colectadas muestras de sangre de los ratones y se realiza un conteo del número de leucocitos circulantes por milímetro cúbico de sangre.⁴⁷ Aunque este ensayo es un medio adecuado para el seguimiento de la TP activa, los ensayos no son muy sensibles, por lo que no resulta conveniente para aplicarlo como método de control de rutina de las vacunas.¹³

Ensayos de toxicidad *in vitro*

En las recomendaciones formuladas recientemente por la OMS para las VAC, se destacó la importancia de fomentar el desarrollo de una alternativa a la prueba de sensibilización de histamina.⁴⁸ El ensayo con células CHO ha sido usado como una prueba *in vitro* para la determinación de TP residual en vacunas.⁴⁹ En este ensayo, las células CHO son incubadas con la TP de referencia o diluciones de las vacunas. La actividad residual de la TP se determina por la formación de agregados, los cuales son observados en un microscopio invertido.⁵⁰ La cantidad de TP activa en las muestras de vacunas puede ser semicuantificada por comparación con un patrón de referencia de concentración conocida.¹³ Aunque el ensayo con células CHO se mencione en la Farmacopea Europea como una alternativa del método de sensibilización a histamina en ratones, aún no existe un protocolo estandarizado.¹¹ En un estudio realizado, se encontró que presentaba limitaciones en su eficacia para predecir la actividad de TP que había sido tratada con formaldehído.⁵⁰ El ensayo con células CHO no es usualmente adecuado para el monitoreo de la formulación final de la vacuna por la presencia del adyuvante.¹³ Sin embargo, en ensayos recientes, se realizó una modificación del ensayo con células CHO, con la utilización de insertos porosos en las placas de cultivo, los cuales eliminaban la necesidad de separar el adyuvante en la formulación final. Los límites de detección logrados en este ensayo fueron de 1-2 IU_{Ptx} /mL. Los resultados obtenidos en la modificación del ensayo, mostraron ser suficientemente sensibles, pero aún sigue siendo un método semicuantitativo, por lo que se requerirá el desarrollo de un método más cuantitativo.¹¹

Recientemente, se ha desarrollado otra alternativa del ensayo de sensibilización a histamina que se realiza por ensayos genéticos.⁵¹ Esta alternativa se basó en los efectos biológicos adversos de TP en los seres humanos. Se utilizó el análisis de microarreglos para encontrar los genes que están específicamente corrientes arriba o corrientes abajo regulados por TP. Esta técnica permite la caracterización simultánea de todos los genes que se ven afectados por TP en un análisis. Usando este enfoque se identificaron seis genes en células dendríticas derivadas de monocitos inmaduros (un tipo de célula relevante para los efectos *in vivo* TP) que fueron específicamente reguladas por TP, donde la IL-2 es el candidato más prometedor para su utilización como biomarcador para la detección de TP durante la producción de vacunas. Este ensayo tiene muchas potencialidades para ser una alternativa *in vitro*, aunque los resultados obtenidos sugieren que todavía no es lo suficientemente sensible para evaluar la seguridad de producto final de la vacuna debido a la limitada sensibilidad de los biomarcadores y la toxicidad provocada por los adyuvantes.¹¹

El otro ensayo que se ha utilizado para evaluar la actividad de la TP, es el ensayo de E-HPLC, el cual se basa en la determinación de la actividad ADP-ribosiltransferasa de la TP.^{52,53} La determinación de esta actividad se realiza utilizando como sustrato un péptido sintético (F-G_{αi3}C20) marcado con fluoresceína acoplado a una columna de cromatografía líquida de alta resolución, método que permite la separación y cuantificación del producto ADP-ribosilado.^{53,54} Aunque el método de E-HPLC se correlaciona bien con la toxicidad observada en el ensayo de histamina, utilizando preparaciones nativas de TP,⁵³ este no tiene en cuenta la actividad de unión del oligómero B. En resultados previos se han obtenido que diferentes VAC han mostrado diferencias en la actividad de ADP-ribosilación.⁵⁴ Estos resultados eran esperados, pues como la toxicidad depende de la capacidad de la enzima de internalizarse en la célula y esta función podría estar afectada por alguna modificación química en el oligómero B, se desarrolló una nueva prueba para la TP, basada en la unión de este B a carbohidratos y la propiedad de adherirse a las células.⁵⁵

La estrategia de usar estos dos métodos: El E-HPLC para medir la actividad tóxica del oligómero A y el de unión a carbohidratos para medir la función de unión a carbohidratos del oligómero B, demostró ser transferible entre laboratorios⁵⁶ y puede ser una alternativa potencial del ensayo *in vivo* de sensibilización de histamina.¹² En 2012, Xing y cols. realizaron varios ensayos en los que utilizaron tres tipos de VAC donadas por GSK de Belgium, Sanofi Pasteur de Canadá y Takeda Pharmaceuticals de Japón, los cuales evidenciaron que el método de E-HPLC en combinación con la unión a carbohidratos era adecuado para determinar la actividad de TP. En este mismo ensayo, no se pudo establecer una correlación directa entre el ensayo de sensibilización a histamina (basado en la reducción de temperatura) y el que se realiza *in vitro* debido a la gran variación en los resultados del ensayo *in vivo*. A pesar de esto, las medias estimadas para la actividad de los ensayos *in vivo* e *in vitro* fueron del mismo orden para los tres productos estudiados.⁵⁶

En el taller sobre alternativas para el ensayo de sensibilización a histamina en las VAC,¹¹ se consideró que los ensayos con células CHO eran los más informativos en cuanto a la función de la TP, ya que evalúan la unión a la célula, la internalización y la actividad enzimática de la toxina. Sin embargo, estos ensayos se consideraron más variables, técnicamente más desafiantes y potencialmente menos sensibles. Además de la interferencia del adyuvante, el cual no permite utilizar el ensayo en las formulaciones finales de la vacuna. En el caso de los ensayos genéticos, se consideró que este tiene el potencial de proporcionar diversos marcadores de actividad de TP en células humanas, lo que no se conoce exactamente si estos biomarcadores están relacionados con la actividad tóxica de TP, además, este ensayo requiere de un equipamiento especial y costoso, que puede no ser aplicable a las necesidades de un producto de rutina. Por otra parte, la combinación del ensayo E-HPLC con la unión a carbohidratos, se consideró más cuantitativo, robusto, rápido, fácil de automatizar, menos variable que el ensayo de histamina y menos costoso. Sin embargo, estos ensayos no reflejan la función de la toxina completa, ya que cada uno de ellos analiza solo una actividad bioquímica de la toxina (ya sea enzimática o de unión).¹¹

CONCLUSIONES

La evaluación de la actividad de TP en las formulaciones vacunales contra *B. pertussis* mediante los ensayos de sensibilización a histamina arrojan resultados variables y requieren del empleo de gran cantidad de ratones; en cambio los métodos *in vitro* desarrollados hasta el momento no tienen estos inconvenientes, aunque cada uno en particular presenta desventajas que no permiten utilizarlos como un único método para evaluar la actividad de TP en VAC. Resulta de gran importancia seguir estandarizando estos métodos o desarrollar otra alternativa que permita realizar un ensayo sensible y específico en la detección de la actividad de TP. También podría tenerse en cuenta como una solución a la utilización de animales, el empleo en paralelo del ensayo de células CHO con las modificaciones propuestas por Isbrucker y la combinación del E-HPLC y la unión a carbohidrato.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(2): 326-82. Epub 2005/04/16.
2. Pertussis vaccine (acellular, component, adsorbed). In: European Pharmacopoeia, version 7.0, vol. 1356; 01/2008. p. 806e7.
3. Adsorbed diphtheria-purified pertussis-tetanus combined vaccine. In: Minimum requirements for biological products. Ministry of Health, Japan, Labour and Welfare; 2004. p. 41e9.
4. WHO position paper *Weekly Epidemiological Record.* 2005; 80: 29-40.
5. Gaines-Das R, Ochiai M, Douglas-Bardsley A, Asokanathan C, Horiuchi Y, Rigsby P, et al. Transferability of dermal temperature histamine sensitization test for estimation of pertussis toxin activity in vaccines. *Hum Vaccin.* 2009; 5(3): 166-71. Epub 2008/09/02.
6. Grondahl-Yli-Hannuksela K, Vuononvirta J, Barkoff AM, Viander M, Van Der Meeren O, Mertsola J, et al. Gene polymorphism in toll-like receptor 4: effect on antibody production and persistence after acellular pertussis vaccination during adolescence. *The Journal of infectious diseases.* 2012; 205(8): 1214-9. Epub 2012/03/03.
7. Title 21. Pertussis vaccine 620.1. U.S. Code of federal regulations. Washington DC: U.S. Government Printing Office; 1983: 58-61.
8. Ibsen PH. The effect of formaldehyde, hydrogen peroxide and genetic detoxification of pertussis toxin on epitope recognition by murine monoclonal antibodies. *Vaccine.* 1996; 14(5): 359-68. Epub 1996/04/01.
9. WHO Expert Committee On Biological Standardization. World Health Organization technical report series. 1998;878:i-vi, 1-101. Epub 1998/09/10.
10. Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women and persons who have or anticipate having close contact with an infant aged <12 months --- Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2011. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2011; 60(41): 1424-6. Epub 2011/10/21.
11. Isbrucker R, Arciniega J, McFarland R, Chapsal JM, Xing D, Bache C, et al. Report on the international workshop on alternatives to the murine histamine sensitization test (HIST) for acellular pertussis vaccines: State of the science and the path forward. *Biologicals : Journal of the International Association of Biological Standardization.* 2014. Epub 2014/01/08.
12. Yuen CT, Horiuchi Y, Asokanathan C, Cook S, Douglas-Bardsley A, Ochiai M, et al. An *in vitro* assay system as a potential replacement for the histamine sensitisation test for acellular pertussis based combination vaccines. *Vaccine.* 2010; 28(21): 3714-21. Epub 2010/03/24.

13. Corbel MJ, Xing DK. Toxicity and potency evaluation of pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2004; 3(1): 89-101. Epub 2004/02/06.
14. Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR. Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children. *Pediatrics*. 1981; 68(5): 650-60. Epub 1981/11/01.
15. Sato Y, Kimura M, Fukumi H. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet*. 1984;1(8369):122-6. Epub 1984/01/21.
16. Cherry JD. Pertussis in the preantibiotic and prevaccine era, with emphasis on adult pertussis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1999; 28 Suppl 2: S107-11. Epub 1999/08/14.
17. Kimura M, Kuno-Sakai H. Pertussis vaccines in Japan *Acta Paediatr*. 1988; 30:143-53
18. Cherry J, Mortimer E. Acellular and whole-cell pertussis vaccines in Japan: report of a visit by US scientists. *JAMA: the Journal of the American Medical Association*. 1987; 257(10):1375-6.
19. Cherry J, Heininger U. Pertussis and other *Bordetella* infections. *Textbook of pediatric infectious diseases*. Philadelphia: The W.B. Saunders Co: 2004: p. 1588-608.
20. Cheung GY, Xing D, Prior S, Corbel MJ, Parton R, Coote JG. Effect of different forms of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* on protection afforded by an acellular pertussis vaccine in a murine model. *Infection and immunity*. 2006; 74(12): 6797-805. Epub 2006/09/20.
21. WHO. Weekly epidemiological record 2010; 85(40): 385-400 [Consultado 29 de noviembre de 2013] Disponible en: <http://www.who.int/wer>.
22. Plotkin S. Revisión. Vacunas en el siglo veintiuno. *Vacunas*. 2002; 3: 18-28.
23. Poland GA. Acellular pertussis vaccines: new vaccines for an old disease. *Lancet*. 1996; 347(8996): 209-10. Epub 1996/01/27.
24. Rappuoli R. Toxin inactivation and antigen stabilization: two different uses of formaldehyde. *Vaccine*. 1994; 12(7): 579-81. Epub 1994/05/01.
25. Pertussis Vaccines, In: USE Code of Federal Regulations. Government Printing Office, DC, USA. 1993: 58-61.
26. Kaslow HR, Burns DL. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1992; 6(9): 2684-90. Epub 1992/06/01.
27. He Q, Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol*. 2008;3(3):329-39. Epub 2008/05/29.
28. Munoz J. Biological activities of pertussigen (pertussis toxin) In: Sekura RD, Moss J, Vaughan M, editors. *Pertussis toxin*. London: Academic Press Inc. 1985 :1-18.
29. Carbonetti NH, Artamonova GV, Andreasen C, Dudley E, Mays RM, Worthington ZE. Suppression of serum antibody responses by pertussis toxin after respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis* and identification of an immunodominant lipoprotein. *Infection and immunity*. 2004; 72(6): 3350-8. Epub 2004/05/25.
30. Donnelly S, Loscher CE, Lynch MA, Mills KH. Whole-cell but not acellular pertussis vaccines induce convulsive activity in mice: evidence of a role for toxin-induced interleukin-1beta in a new murine model for analysis of neuronal side effects of vaccination. *Infection and Immunity*. 2001; 69(7): 4217-23. Epub 2001/06/13.
31. Andreasen C, Powell DA, Carbonetti NH. Pertussis toxin stimulates IL-17 production in response to *Bordetella pertussis* infection in mice. *PloS one*. 2009; 4(9): e7079. Epub 2009/09/18.
32. Hoonakker ME, Ruitkamp N, Hendriksen CF. The cAMP assay: a functional *in vitro* alternative to the *in vivo* Histamine Sensitization test. *Vaccine*. 2010; 28(5): 1347-52. Epub 2009/11/28.

33. Katada T. The inhibitory G protein G(i) identified as pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2012;35(12):2103-11. Epub 2012/12/05.
34. Babu M Madan BJ, Saund Ranajeet Singh, Kumar Singh S. Virulence factors of *Bordetella pertussis* *Current science*. 2001; 80(12): 1512-22.
35. Gentile A. Bordetella pertussis infection. *Arch Argent Pediatr*. 2010;108(1):78-81. Epub 2010/03/06. Infeccion por Bordetella pertussis.
36. Locht C, Antoine R. In: Bacterial protein toxins, Alouf JE, Freer JH, editors. *Bordetella pertussis* protein toxins. second ed. London: Academic Press Inc; 1999 :130-46.
37. Oh H, Joung J, Kim BG, Nam KT, Hong SH, Song HC, et al. Improved protocols for histamine sensitization testing of acellular pertussis vaccines. *Vaccine*. 2012; 30(50): 7246-52. Epub 2012/10/23.
38. WHO. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular Pertussis vaccines 2011.
39. Ishida S, Kurokawa M, Asakawa S. A new biological assay method for histamine-sensitizing factor using survival time as a response. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*. 1976; 29(3): 139-50. Epub 1976/06/01.
40. Corbel MJ, Xing DK, Bolgiano B, Hockley DJ. Approaches to the control of acellular pertussis vaccines. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*. 1999; 27(2): 133-41. Epub 1999/12/22.
41. Ministry of Health, Labour and Welfare, Japanese Government. Minimum Requirements for Biological Products; 2004.
42. Pittman M. Determination of the histamine sensitizing unitage of pertussis vaccine. *Journal of Biological Standardization*. 1975; 3(2): 185-91. Epub 1975/01/01.
43. Corbel MJ, Kreeftenberg JG, Knezevic I. WHO Working Group on the standardisation and control of pertussis vaccines-report of a meeting held on 6-7 May 2003, Ferney Voltaire, France. *Vaccine*. 2004; 22(3-4): 293-300. Epub 2003/12/13.
44. Van Straaten-van de Kappelle I, Van der Gun JW, Marsman FR, Hendriksen CF, Van de Donk HJ. Collaborative study on test systems to assess toxicity of whole cell pertussis vaccine. *Biologicals: journal of the international Association of Biological Standardization*. 1997; 25(1): 41-57. Epub 1997/03/01.
45. Ochiai M, Yamamoto A, Kataoka M, Toyozumi H, Arakawa Y, Horiuchi Y. Highly sensitive histamine-sensitization test for residual activity of pertussis toxin in acellular pertussis vaccine. *Biologicals : journal of the international Association of Biological Standardization*. 2007;35(4):259-64. Epub 2007/03/17.
46. Jensen SE, Illigen KE, Badsberg JH, Haslov KR. Specificity and detection limit of a dermal temperature histamine sensitization test for absence of residual pertussis toxin in vaccines. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*. 2012;40(1):36-40. Epub 2011/10/18.
47. Requeriments for diptheria, tetanus, pertussis and combined vaccines: In WHO Technical Report Series No. 800. 1990: 87-149.
48. WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization Technical Report Series. 2013 (979): 1-366, back cover. Epub 2013/12/18.
49. Gillenius P, Jaatmaa E, Askelof P, Granstrom M, Tiru M. The standardization of an assay for pertussis toxin and antitoxin in microplate culture of Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Standardization*. 1985; 13(1): 61-6. Epub 1985/01/01.
50. Kataoka M, Toyozumi H, Yamamoto A, Ochiai M, Horiuchi Y. Chinese hamster ovary (CHO) cell clustering does not correlate with *in vivo* histamine-sensitization when measuring residual activity of aldehyde-treated pertussis toxin (PT). *Biologicals: Journal*

- of the International Association of Biological Standardization. 2002; 30(4): 297-302. Epub 2002/11/08.
51. Vaessen SF, Verkoeijen S, Vandebriel RJ, Bruysters MW, Pennings JL, Bos R, *et al.* Identification of biomarkers to detect residual pertussis toxin using microarray analysis of dendritic cells. *Vaccine*. 2013; 31(45): 5223-31. Epub 2013/09/24.
 52. Yuen CT, Canthaboo C, Menzies JA, Cyr T, Whitehouse LW, Jones C, *et al.* Detection of residual pertussis toxin in vaccines using a modified ribosylation assay. *Vaccine*. 2002; 21(1-2): 44-52. Epub 2002/11/22.
 53. Graf R, Codina J, Birnbaumer L. Peptide inhibitors of ADP-ribosylation by pertussis toxin are substrates with affinities comparable to those of the trimeric GTP-binding proteins. *Molecular pharmacology*. 1992; 42(5): 760-4. Epub 1992/11/01.
 54. Gomez SR, Yuen CT, Asokanathan C, Douglas-Bardsley A, Corbel MJ, Coote JG, *et al.* ADP-ribosylation activity in pertussis vaccines and its relationship to the *in vivo* histamine-sensitisation test. *Vaccine*. 2007; 25(17): 3311-8. Epub 2007/02/09.
 55. Gomez SR, Xing DK, Corbel MJ, Coote J, Parton R, Yuen CT. Development of a carbohydrate binding assay for the B-oligomer of pertussis toxin and toxoid. *Analytical Biochemistry*. 2006; 356(2): 244-53. Epub 2006/06/20.
 56. Xing D, Yuen CT, Asokanathan C, Rigsby P, Horiuchi Y. Evaluation of an *in vitro* assay system as a potential alternative to current histamine sensitization test for acellular pertussis vaccines. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*. 2012; 40(6): 456-65. Epub 2012/08/15.