

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EFICIENCIA DE LOS TOXOIDES DIFTERICOS*

LOUIS GREENBERG, Ph.D.

Jefe de los Laboratorios de Control Biológico, Laboratorio de Higiene, Departamento Nacional de Sanidad y Asistencia Social, Ottawa, Canadá

En el curso de la última década se ha registrado un considerable progreso en la elaboración de medidas profilácticas, seguras y eficaces, de la difteria, y aumenta cada día el número de las que se utilizan en el mundo. La Conferencia de Jefes de Laboratorios de Vacunas contra la Difteria y la Pertusis que, organizado por la OMS, se celebró en Dubrovnik, Yugoslavia, en 1952, (12) hizo una lista de nuevo tipos diferentes, todos ellos actualmente en uso. A medida que se van aplicando nuevos productos, se hace más difícil la selección de los mejores. Ocurre así porque, si bien se reconoce de un modo general, que ciertos tipos de antígeno son más eficaces que otros—por ejemplo, el toxoide diftérico adsorbido en comparación con el toxoide líquido—se sabe relativamente poco de la eficacia que, comparadas unas con otras, tienen las preparaciones procedentes de distintos laboratorios y de distintos países. Para llenar esta laguna, se buscaron toxoides diftéricos fabricados en Canadá, en Estados Unidos, en varios países europeos, la Unión Sudafricana y la India, y, aplicando técnicas descritas previamente, (3) se analizaron todas las preparaciones en el Laboratorio de Higiene del Departamento Nacional de Sanidad y Beneficiencia, de Ottawa, utilizando como control el patrón líquido canadiense de referencia III. El presente informe trata de los resultados de dicho estudio.

RESULTADOS

Se analizaron 79 toxoides preparados por 20 fabricantes de 11 países. Los resultados aparecen en el Cuadro, y sus valores se expresan en función del patrón canadiense de referencia. Se indican en la tabla, además,

* Publicado en inglés en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 12 No. 5, 1955.

los siguientes datos acerca de cada preparación: la dosis Lf por ml., la dosis Lf requerida para producir el efecto de una “unidad protectora”, la dosis recomendada por el fabricante, el número de unidades protectoras de la inyección inicial y, por último, el número total de unidades requeridas para la inmunización primaria completa. La unidad a que se hace referencia en el texto y en la tabla es la unidad de protección alemana “Schutz-Einheit” (SE); en la fecha en que se escribió este artículo, no se había establecido aún una unidad internacional. En el curso de nuestro estudio se hicieron sobre los toxoides las observaciones que se consignan a continuación por orden de actividad:

1. *Toxoide purificado, precipitado con fosfato de aluminio (TPFA) (4)*

Se comprobó que el TPFA era la preparación más activa de todas las estudiadas. Su actividad básica—es decir, la dosis Lf requerida para producir el efecto de una unidad de protección SE (indicada en la columna 6 del Cuadro)—osciló entre 0,2 y 0,9 Lf, y dió un promedio de 0,37 Lf. Este tipo de toxoide fué, aproximadamente, cuatro o cinco veces más activo que el toxoide corriente precipitado con alumbre.

2. *Disolución de flóculos (DF) y disolución de flóculos adsorbida en fosfato de aluminio (DFA) (6, 7)*

Estos productos se preparan disolviendo flóculos de toxoide y antitoxina en N/20 NaOH. El toxoide así obtenido se halla en forma altamente purificada y al ser adsorbido en fosfato de aluminio (DFA) se convierte en un antígeno muy activo. Sola-

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE TOXOIDES DIFTERICOS

País	Laboratorio y No. del lote	Toxoide	Actividad en compa- ración con el patrón canadiense	Lf por ml	Actividad básica*	Dosis recomendada	Dosis			
							Inicial SE	Total SE		
I	A	1	D-T-P (TPFA)	14,3	20	0,3	3 × 1,0	62,9	188,7	
		2	D-T-P (TPFA)	21,6	20	0,2	3 × 1,0	95,0	285,0	
		3	D-T-P (TPFA)	9,8	10	0,2	3 × 1,0	43,1	129,3	
		4	D-T-P (TFL)	2,8	50	4,1	3 × 1,0	12,3	36,9	
		5	D-T-P (TFL)	4,4	50	2,6	3 × 1,0	4,4	13,2	
	B	6	D (TFL)	1,2	50	9,4	3 × 1,0	5,3	15,9	
		7	D-T-P (TFL)	2,1	40	5,4	3 × 1,0	9,2	27,6	
		8	D-P (TFL)	1,8	40	5,1	3 × 1,0	7,9	23,7	
		9	D (TPA)	13,0	30	0,5	2 × 1,0	57,2	114,4	
II	C	10	D (TFL)	2,1	80	8,7	3 × 0,5	4,6	13,8	
		11	D-T-P (TPA)	21,4	70	0,7	3 × 0,5	49,1	147,3	
		12	D-T (TPA)	26,4	80	0,7	2 × 0,5	58,1	116,2	
		13	D-P (TFL)	7,3	80	2,5	3 × 0,5	16,1	48,2	
	D	14	D (TFL)	1,9	50	6,0	3 × 0,5	4,2	12,6	
		15	D-P (TFL)	3,6	50	3,2	3 × 0,5	7,9	23,7	
		16	D-P (TPA)	6,0	33,4	1,3	3 × 0,5	13,2	39,6	
		17	D-P (TPA)	2,1	33,4	3,6	3 × 0,5	4,6	13,8	
		18	D-T (TFL)	0,7	50	17,5	3 × 0,5	1,5	4,4	
	E	19	D-T (TPA)	7,2	62	2,0	2 × 0,5	15,9	31,7	
		20	D (TPA)	7,4	68	2,1	2 × 0,5	16,3	32,6	
		21	D (TFL)	1,5	78	11,8	3 × 0,5	3,3	9,9	
		22	D-T-P (TPA)	9,4	58	1,4	3 × 0,5	20,7	62,1	
	III	F	23	D-T-P (TPA)	3,8	9	0,5	3 × 0,5	8,4	25,1
			24	D-P (TPA)	6,6	24	0,8	3 × 0,5	14,5	43,5
			25	D-T (TPA)	5,5	14	0,6	2 × 0,5	12,1	24,2
			26	D (TFL)	0,3	24	7,7	3 × 1,0	3,1	9,3
		G	27	D-T (TPA)	7,8	80	2,3	2 × 0,5	17,2	34,4
28			D-T-P (TFL)	10,2	50	1,4	3 × 1,0	37,0	111,0	
29			D-T-P (TPA)	8,4	60	1,6	3 × 0,5	18,5	55,5	
30			D-P (TPA)	9,2	60	1,5	3 × 0,5	20,3	60,9	
31			D-P (TPFA)	24,4	30	0,3	3 × 0,5	53,7	161,1	
H		32	D (TPA)	2,4	82	7,7	2 × 0,5	5,3	10,6	
		33	D-T-P (TPA)	9,6	27	0,6	3 × 0,5	21,0	63,0	
	34	D-T (TPA)	2,3	20	2,0	2 × 1,0	10,0	20,0		
IV	I	35	D-P (TFL)	1,5	28	4,2	3 × 1,0	6,6	19,8	
		36	D (TPFA)	13,1	50	0,9	2 × 0,5	28,8	57,6	
		37	D (TFL)	0,7	50	16,1	3 × 1,0	3,1	9,3	
	J	38	D (TPA)	24,5	65	0,6	2 × 0,5	53,9	107,8	
		39	D (TPFA)	42,4	75	0,4	2 × 0,5	93,3	186,6	
		40	D (TFL)	4,2	65	3,5	3 × 0,5	9,2	27,7	
		41	D-P (TPA)	25,0	32	0,3	3 × 1,0	110,0	330,0	
	K	42	D-P (TPFA)	24,8	28	0,3	3 × 1,0	109,0	327,0	
		43	D-P (TFL)	5,9	35	1,3	3 × 1,0	26,0	78,0	
		44	D (TPFA)	33,6	56	0,4	2 × 0,5	74,0	148,0	
		45	D (TPFA)	45,4	63	0,3	2 × 0,5	100,0	200,0	
		46	D (TFL)	3,4	70	4,7	3 × 0,5	7,5	22,5	
V	L	47	D (TFL)	0,7	20	6,5	3 × 1,0	3,1	9,3	
		M	48	D (TFL)	1,7	50	6,7	3 × 1,0	7,5	22,5
	N	49	D (TF)	6,4	30	1,1	2 × 0,5	14,1	28,2	
V	50	D (TF)	7,3	30	1,0	2 × 0,5	16,0	32,0		
	51	D (TF)	12,5	30	0,5	2 × 0,5	27,5	55,0		
	52	D (TF)	13,9	30	0,5	2 × 0,5	30,6	61,2		

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE TOXOIDES DIFTERICOS—Cont.

País	Laboratorio y No del lote	Toxoide	Actividad en comparación con el patrón canadiense	Lf por ml.	Actividad básica*	Dosis recomendada	Dosis	
							Inicial SE	Tota SE
	53	D (TF)	12,9	30	0,5	2 × 0,5	28,4	56,8
	54	D (TF)	9,8	30	0,7	2 × 0,5	21,6	43,1
	55	D-P (TF)	11,3	30	0,6	3 × 0,5	25,0	75,0
	56	D-T (TF)	8,5	30	0,8	2 × 0,5	18,7	56,1
	O 57	D-T (TPHA)	3,3	12,5	0,9	2 × 1,0	14,5	29,0
	58	D-T (TPHA)	1,7	12,5	1,7	2 × 1,0	7,4	14,8
	59	D-T (TPHA)	11,9	50	1,0	2 × 1,0	52,4	104,8
VI	60	D-T (TPHA)	12,4	50	0,9	2 × 1,0	54,6	109,2
	61	D (TPHA)	12,7	12,5	0,2	2 × 1,0	55,9	111,2
	62	D (TPHA)	5,0	12,5	0,6	2 × 1,0	21,9	43,8
	63	D (TPHA)	6,1	50	1,9	2 × 1,0	26,8	53,6
	64	D (TPHA)	10,7	50	1,1	2 × 1,0	47,1	94,2
VII	P 65	D (TFL)	0,8	50	13,6	3 × 1,0	3,7	11,1
	66	D (TPA)	14,6	90	1,4	2 × 1,0	64,2	128,4
VIII	Q 67	D (TPA)	21,5	50	0,5	2 × 1,0	94,6	189,2
	68	D (TPA)	22,4	40	0,4	2 × 1,0	98,6	197,2
	69	D (TFL)	2,1	110	12,0	2 × 1,0	9,2	18,4
	70	D (TFL)	1,2	90	17,0	2 × 1,0	5,3	10,6
IX	R 71	D (TFL)	0,5	71	32,2	3 × 1,0	2,2	6,6
	72	D-P (TFL)	1,6	72	10,2	3 × 1,0	6,9	20,7
	73	D-T (TFL)	0,24	65	59,1	3 × 1,0	1,1	3,3
	74	D-TAB (TFL)	0,6	68	27,2	3 × 1,0	2,5	7,5
X	S 75	D (DFA)	35,3	50	0,3	1a. dosis 0,5 ml. DF	78,0	90-130
	76	D (DF)	3,2	50	3,5	2a. dosis 1,0 ml. FDA	7,0	
	77	D (DFA)	26,0	50	0,4		57,0	
	78	D (DF)	7,1	50	1,6		15,6	
XI	T 79	D (TFAN)	2,7	50	4,2	?	?	?

* Número de Lf requerido para producir el efecto de "una unidad protectora" (SE)

D = Toxoide diftérico

D-P = Toxoide diftérico combinado con vacuna pertúsica

D-T = Toxoide diftérico combinado con toxoide tetánico

D-T-P = Toxoide diftérico combinado con toxoide tetánico y con vacuna pertúsica

mente se ensayaron dos lotes, uno de DF y el otro de DFA. Las actividades básicas de DFA resultaron ser 0,3 y 0,4 Lf, lo que indica que son equivalentes al TPHA. Las potencias básicas de DF fueron 3,5 y 1,6, o sea algo mayores que la del toxoide líquido ordinario.

3. *Toxoide de fosfato (TF)* (11)

El TF es una modalidad del TPHA que, en los ensayos realizados demostró ser también muy activo. Su actividad básica osciló entre, 0,5 y 1,1 Lf por SE, y el promedio fué de 0,7.

4. *Toxoide purificado, adsorbido en hidróxido de aluminio (TPHA)* (9, 10)

Este fué el tipo de preparación que, en los ensayos, siguió en orden de efectividad. Las actividades básicas de los ocho lotes ensayados variaron de 0,2 a 0,9 Lf, y su promedio fué de 1,0 Lf por SE.

5. *Toxoide precipitado con alumbre (TPA)*

La actividad básica varió de 0,3 a 7,7 Lf, y su promedio fué de 1,5 Lf por SE. En general, estas preparaciones no fueron tan activas como las preparaciones purificadas a que ya se ha hecho referencia, pero resulta-

ron ser considerablemente más activas que los toxoides líquidos.

6. *Toxoides de formol, crudo y purificado (toxoides líquidos) (TFI)*

Por lo general, estas preparaciones no fueron tan activas como las dadas en combinación con la vacuna antipertúsica o las preparaciones adsorbidas. La actividad básica del toxoide líquido administrado separadamente osciló entre 3,5 y 17,0 Lf por SE, y su promedio fué de 11,0 Lf. Combinado con vacuna antipertúsica, se produce una indudable vigorización y la actividad se multiplica por tres o más, y la actividad básica oscila entre 1,3 y 10,2 Lf por SE, y da un promedio de 4,0 Lf. Nuestros resultados (que no aparecen en el Cuadro) indican que la purificación reduce la actividad de los toxoides líquidos.

7. *Toxoides de factor adyuvante natural (TFAN) (5)*

El TFAN es un producto que se prepara añadiendo al toxoide purificado impurezas recuperadas en la elaboración del toxoide diftérico crudo de proteosa-peptona de ternera. La adición de esta substancia no específica actúa como adyuvante. En nuestros ensayos, se observó que este producto tiene una actividad básica de 4,2 Lf por SE.

COMENTARIO

Del Cuadro se desprende que existe una considerable variación en la actividad básica de los toxoides preparados por diferentes fabricantes. Esta variación se acentúa frecuentemente por diferencias en el contenido Lf del producto acabado, y así aparece en la columna 4 del Cuadro que la actividad de los productos acabados y puestos en venta oscilan entre 0,24 del patrón canadiense de referencia, y 45,4 veces la actividad de dicho patrón. Es decir, que hay unas preparaciones que son 189 veces más activas que otras. Pero si se tienen en cuenta el número de unidades protectoras contenido en las dosis de las diferentes preparaciones recomendadas para la inmunización activa, esa oscila-

ción no es tan amplia. No obstante, aun en este caso las variaciones son considerables. La dosis para la inyección inicial oscila de 1,1 a 110 SE, y la correspondiente a la inmunización primaria completa, 3,3 a 330 SE. No pueden considerarse como aceptables las variaciones de esta magnitud, sobre todo teniendo en cuenta que está demostrado (1) que el ensayo de toxoide diftérico realizado en cobayos constituye una indicación de la actividad inmunizadora en el hombre (incluso cuando en la inmunización se usan dos o más inyecciones).

En todo programa de inmunización, tiene una importancia primordial la selección de un antígeno de gran eficacia. Del presente estudio se desprende que hoy son ya muchos los antígenos excelentes de que se dispone, pero siendo tantos y tan variados los productos puestos a la venta ¿cómo adquirir la seguridad, aunque sólo sea relativa, de que se va a elegir uno de buena calidad? Las diferencias de actividad en los toxoides nada tienen de sorprendente. Desde hace años se sabe que los toxoides adsorbidos son más eficaces que los líquidos y, por otra parte, la antigenicidad del TPA manufacturado en diferentes laboratorios forzosamente ha de variar, porque la preparación del TPA es un proceso esencialmente empírico. Sin embargo, los progresos recientes en la purificación de antígenos se han traducido en una mayor uniformidad del producto, y actualmente son muchos los fabricantes que producen regularmente toxoides de una actividad dada. Este punto aparece ilustrado claramente en la columna 6 del Cuadro. Se observará, por ejemplo, que los lotes sucesivos de TPFA producidos por el fabricante A son casi idénticos en cuanto a actividad básica, entendiéndose por tal el número de Lf necesario para producir el efecto de una SE. Del mismo modo, los lotes de TF producidos en el laboratorio N son de una regularidad notable, y se podrían citar otros ejemplos igualmente buenos. Estos resultados indican además que, siguiendo un procedimiento uniforme, se pueden elaborar productos de una actividad similar en

diferentes laboratorios. Así vemos que, entre los cinco laboratorios (A, G, I, J, K) que fabrican TPFA, cuatro de ellos elaboraron productos cuyo margen de variación osciló entre 0,2 y 0,4 Lf por SE, mientras la muestra del quinto (laboratorio I) fué de 0,9 Lf por SE.

No obstante, incluso con el empleo de procedimientos uniformes, son inevitables las diferencias, y tiene importancia suma que las pruebas de control empleadas permitan comprobar las variaciones de actividad entre las diferentes marcas y entre los distintos lotes de una misma marca de toxoides. Sin duda alguna, los resultados obtenidos indican la insuficiencia de las pruebas de actividad mínima que imponen actualmente la mayoría de los Gobiernos. Urge mucho establecer métodos de estandarización más precisos, entendiendo por tales una adecuada verificación, a base de un patrón estable conocido y concebido de manera que el grado de seguridad que ofrezcan los resultados se pueda calcular por los datos obtenidos en la propia prueba. Desde este punto de

vista, el actual Patrón Internacional de Toxoide Diftérico, Sencillo, tiene sus limitaciones (2, 8). Sin embargo, es de esperar que la adopción de un Patrón Internacional de Toxoide Diftérico, Adsorbido, que en la actualidad está preparando el Comité de Expertos en Estandarización Biológica, de la OMS (13, 14) contribuya considerablemente a satisfacer las exigencias prácticas; y el establecimiento de una Unidad Internacional, de igual actividad que la SE alemana, como el Comité tiene intención de hacer, sería asimismo de gran utilidad (13). Por último, debe tenerse en cuenta que aún no se ha determinado la dosis eficaz máxima para seres humanos, y es esencial que esto se haga antes de establecer los límites de actividad de los toxoides diftéricos. No sólo hay que precaverse, en efecto, contra los productos de baja actividad, sino también contra la posibilidad de emplear dosis excesivas. Un toxoide antigénico demasiado activo puede, en realidad, atenuar la formación de anticuerpos.

ANEXO I

LABORATORIOS QUE ENVIARON MUESTRAS PARA EL ESTUDIO

Canadá

Dr. A. Frappier
Institut de Microbiologie et d'Hygiène
Universidad de Montreal
Montreal, Quebec

Dr. P. J. Maloney
Connaught Medical Research Laboratories
Universidad de Toronto
Toronto, Ontario

Dinamarca

Dr. Inga Scheibel
Statens Seruminstitut
Copenhague

España

Dr. J. Megías
Instituto Llorente
Madrid

Estados Unidos

Dr. G. D. Brigham
Parke, Davies and Co.
Detroit, Michigan

Dr. B. Scott Fritz
Wyeth Laboratories Inc.
Marietta, Pensilvania

Dr. E. G. Gerwe
Eli Lilly and Co.
Indianápolis, Indiana

Mr. R. P. Knerr
The National Drug Co.
Swiftwater, Pensilvania

Dr. H. D. Piersma
Lederle Laboratories Division
American Cyanamid Co.
Pearl River, Nueva York

Dr. Walter E. Ward
Cutter Laboratories
Berkeley, California

Francia

Dr. L. P. Delpy
Institut Merieux
Marcy-l'Etoile (Ródano)

India

Dr. D. C. Lahiri
Haffkine Institute
Bombay

Italia

Dr. D. d'Antona
Istituto Sieroterapico e Vaccinogeno Toscano
Sienna

Países Bajos

Dr. A. Tasman
Instituto Nacional de Salud Pública
Utrecht

Reino Unido

Miss Mollie Barr
Wellcome Research Laboratories
Beckenham, Kent

Dr. J. E. Crofts
Glaxo Laboratories Ltd. Greenford, Middlesex

Dr. L. B. Holt
The Wright-Fleming Institute of Microbiology
St. Mary's Hospital Medical School
Londres

Turquía

Dr. Nusret Fisek
Instituto Central de Higiene
Ankara

Unión Sudafricana

Dr. J. H. Mason
South African Institute for Medical Research
Johannesburgo

RECONOCIMIENTO

El autor agradece al Dr. R. H. Regamey, del Institut Sérothérapique et Vaccinal Suisse, Berna, Suiza, su concurso en la tarea de conseguir especímenes para este estudio. También da las gracias al Dr. E. T. Bynoe por su asesoramiento y

por las observaciones críticas formuladas durante la preparación de este artículo, y a la Srta. C. Benner y al Sr. E. J. Hamilton por la asistencia técnica prestada.

REFERENCIAS

- (1) Fleming, D. S., y Greenberg, L.: *Canad. Med. Assn. Jour.*, 62:146, 1950.
- (2) Greenberg, L.: *Bol. Org. Mund. Salud*, 9:829, 1953.
- (3) Greenberg, L., y Roblin, M.: *Jour. Immunol.*, 59:221, 1948.
- (4) Holt, L. B.: *Developments in diphtheria prophylaxis*, Londres, 1950.
- (5) Lahiri, D. C.: *Indian Jour. Med. Res.*, 39:229, 1951.
- (6) Mason, J. H.: *Jour. Hyg. (Lond.)*, 48:418, 1950.
- (7) Mason, J. H.: *Lancet*, 1:504, 1951.
- (8) Prigge, R.: *Bol. Org. Mund. Salud*, 9:843, 1953.
- (9) Scheibel, I. F.: *Acta path. microbiol. scand.*, 21:130, 1944.
- (10) Schmidt, S., y Hansen, A.: *Acta path. microbiol. scand.*, Supl. 16, pág. 407, 1933.
- (11) Tasman, A., y Ramshorst, J. D. van: *Leeuwenhoek ned Tijdschr.*, 17:153, 1951.
- (12) Organización Mundial de la Salud, Conferencia de Jefes de Laboratorios de Vacunas contra la Difteria y la Pertusis, *Wld. Hlth. Org. Tech. Rep. Ser.* 61, 1953.
- (13) Organización Mundial de la Salud, Comité de Expertos en Estandarización Biológica, *Wld. Hlth. Org. Tech. Rep. Ser.* 56:4, 1952.
- (14) Organización Mundial de la Salud, Comité de Expertos en Estandarización Biológica, *Eighth Report* (pendiente de publicación en *Wld Hlth. Org. Tech. Rep. Ser.*), 1955.