



ARMONIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE POTENCIA DE TOXOIDES D Y T

**Juan L. Arciniega, D.Sc
LMDQC/CBER/FDA**



Plan de la presentación

- Descripción de los métodos de EUA y de la OMS para medir potencia de toxoides
- Comparación de sus ventajas y limitaciones
- Actividades conducentes a la armonización de ambos métodos



Prueba de potencia para toxoides: Fundamento general

- Propósito: Estimar en un modelo animal adecuado la capacidad del lote de prueba para inducir una respuesta protectora análoga a la de lotes de eficacia comprobada en humanos
- La prueba consiste de 2 etapas:
 1. Inducción en animales de una respuesta protectora
 2. Medición de la respuesta por un método directo (**desafío**) or indirecto (**serológico**)



Pruebas de potencia norteamericanas para los toxoides: Fundamento específico

- Pruebas oficiales de potencia para toxoides adsorbidos: inducción de antitoxina en cobayos
- Descritas en los Requisitos Mínimos:
 - Difteria (D) 1 de marzo de 1947
 - Tétanos (T) 15 de Diciembre de 1952
 - Td (para adultos) 15 de Agosto de 1953 (modificados el 28 de November de 1956)
- Se usan los mismos cobayos para probar la potencia de D/d y T



Pruebas de potencia norteamericanas para los toxoides: Procedimiento

**Lote
pba**



≤ 28 días/D

≤ 42 días/T

**Diluciones de la
mezcla de suero
+ 1L+ toxin**

Al menos 4 cobayos

**1 Unidad de antitox
+ 1L+ toxin**

2 cob por dil



2 cob cont

Registrar protección a las 96 h



Pruebas de potencia norteamericanas para los toxoides: Resultados

Validez:

- Los cobayos control (inyectados con 1 L+ combinado con 1 U de Antitoxina Estándar de los EUA: hiperinmune, de caballo) mueren a las ≤ 96 h

Aceptación:

- La dilución de la mezcla de suero que protege a los cobayos de la muerte > 96 h contendrá ≥ 1 U/mL de antitoxina; así, si la mezcla se diluyó 1:2, el suero sin diluir contenía ≥ 2 U/mL de antitoxina

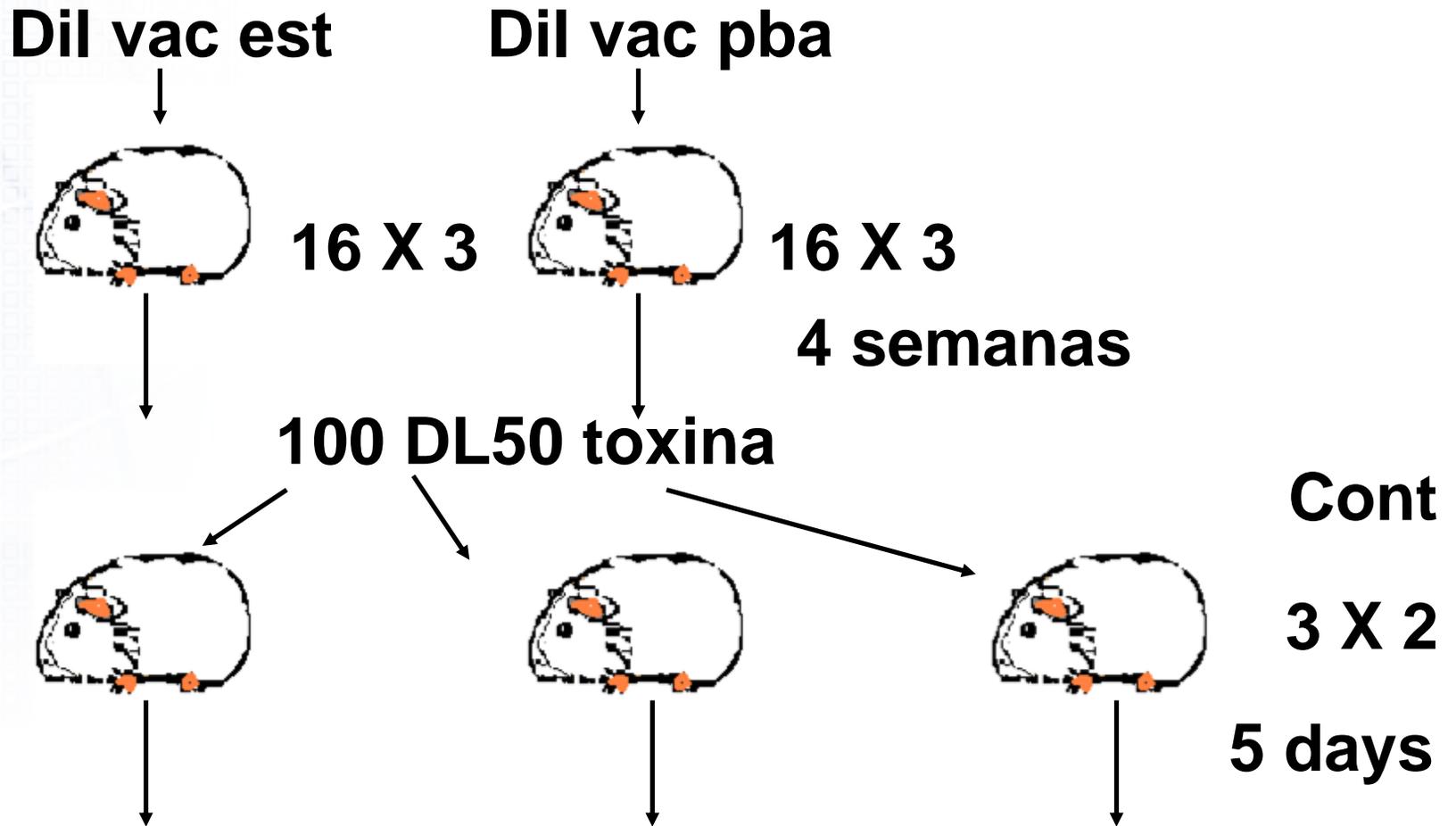


Pruebas de potencia norteamericanas para los toxoides: Resultados (Cont.)

- Para pasar la prueba:
 - D debe inducir por lo menos 2 U/mL de antitoxina
 - d debe inducir por lo menos 0.5 U/mL de antitoxina
 - T debe inducir por lo menos 2 U/mL de antitoxina



Método general OMS para medir la potencia de los toxoides: Procedimiento

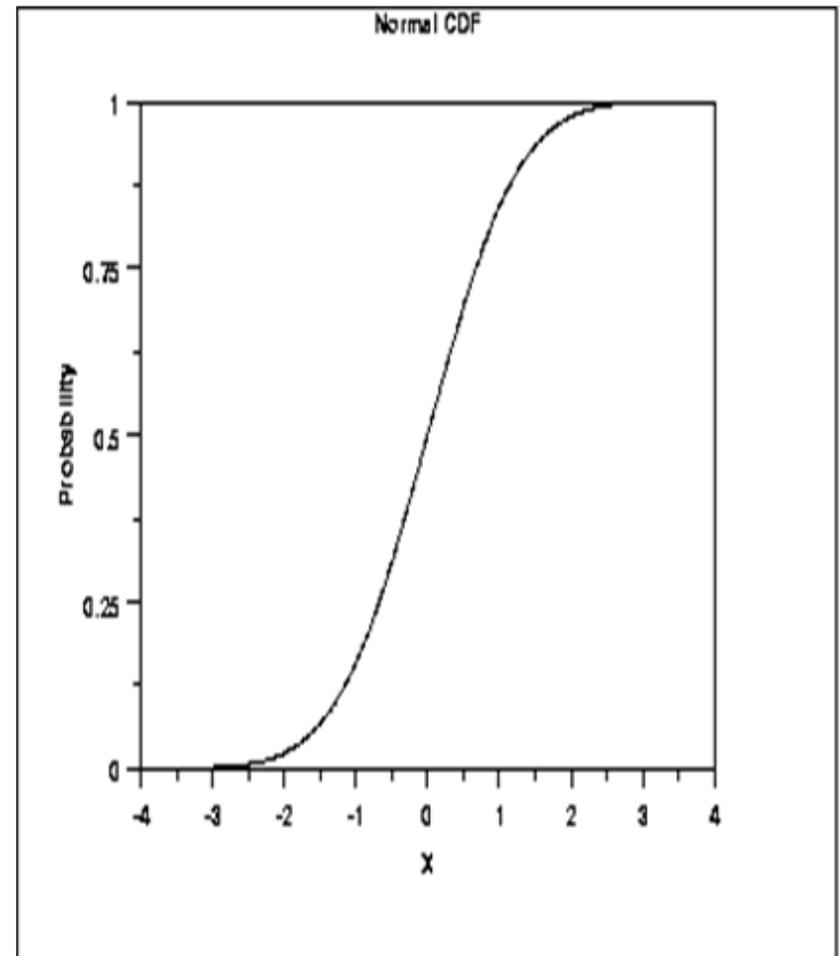


Contar sobrevivientes; calcular potencia en relación con la vacuna estándar: líneas paralelas respuesta cuantitativa (todo o nada)



Probita: Una transformación o metámetro

La probita es un metámetro de la proporción de reactores y representa la abcisa correspondiente a una probabilidad P en una distribución normal con media 5 y varianza 1





Potencia relativa (análisis probit)

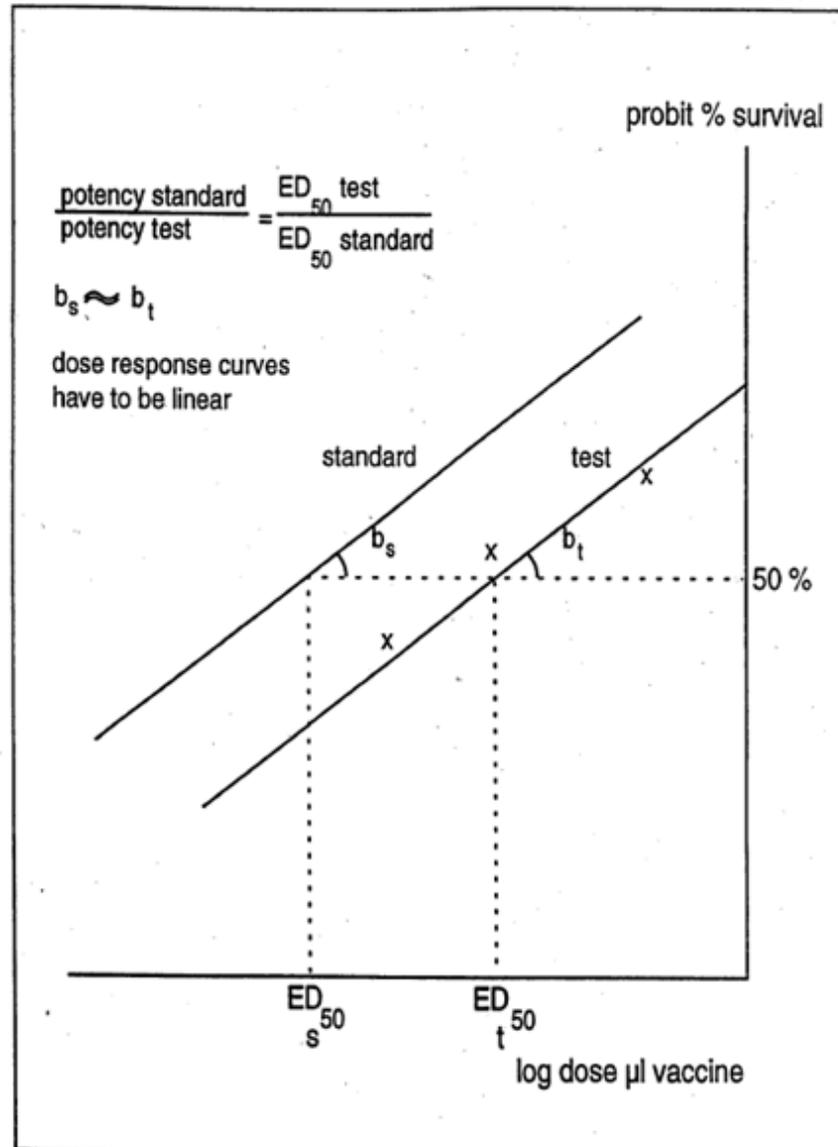


Figure 3. Probit analysis (reproduced from 4)



Método general OMS para medir la potencia de los toxoides: Resultados

Validez:

- Se debe confirmar el número de DL50 en la dosis de desafío (50 – 200), usando normalmente 3 grupos de cobayos sin inmunizar
- El intervalo de confianza para el estimado de la potencia debe ser entre 50 y 200%:
 - **Deben usarse suficientes animales por dosis para asegurar esta precisión; habitualmente 16**

Aceptación:

- El toxoide debe contener ≥ 30 UI (D) o ≥ 40 UI (T) por dosis sencilla humana (normalmente 0.5 mL)



Situación actual

- Ambas pruebas de potencia (OMS y EUA) se han usado por muchos años
- No existen indicaciones de que una de ellas sea mejor que la otra para predecir eficacia en humanos:
 - Ambas se basan en nuestro conocimiento de la protección contra la difteria y el tétanos (inducción de antitoxina)
 - Ambas son consistentes con la liberación de lotes de toxoide eficaces



Inquietudes principales con el método de los EUA

- No se usa una vacuna estándar para controlar la variabilidad de las pruebas
- No se puede calcular la precisión del estimado al mezclar los sueros
- El uso de una dosis relativamente alta para inmunizar vuelve al método insensible para detectar cambios en la cantidad/calidad del toxoide



Inquietudes principales con el método general de la OMS

- Muy costoso:
 - ≥ 100 animales por prueba
 - No se pueden usar los mismos animales para evaluar la potencia de ambos toxoides
 - A los animales se les expone a una dosis letal de toxina

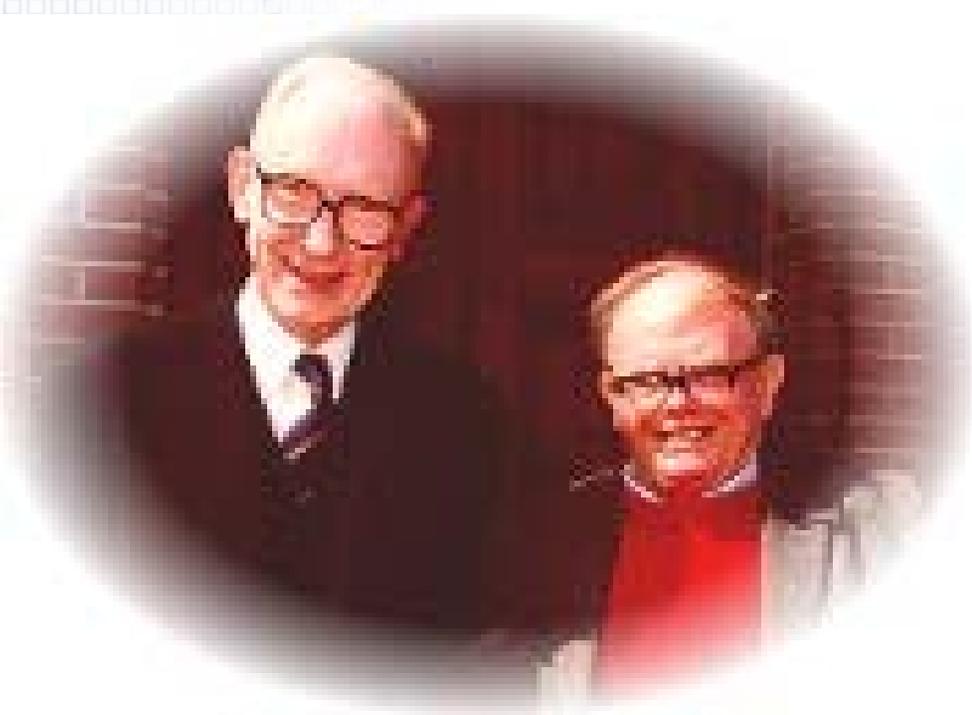


Incentivos para la armonización de pruebas

- **Aceptación mutua de resultados, porque se usaron métodos comunes o compatibles**
- **Ahorro de recursos: el fabricante no necesita medir la misma característica usando pruebas distintas**



Las 3 R de Russell y Burch (1958)



- **Reemplazo:** uso de material insensible en lugar de vertebrados vivos y conscientes
- **Reducción:** disminución del número de animales requeridos para obtener suficiente información de la precisión adecuada
- **Refinamiento:** cualquier avance que conduzca a una disminución de la incidencia o severidad de procedimientos inhumanos aplicados a los animales que tienen que usarse



Método de la OMS: (OMS SIT 800, 1990; Adendo 2003 en prensa) - 1

Refinamiento y reducción:

- Se pueden usar pruebas de dilución única tras el registro
- Resultado de la inmunización:
 - Protección contra la parálisis (T)?
 - Protección contra el eritema (D)
 - Medición de antitoxina *in vitro*:
 - ✓D: Ensayo de Células Vero (ECV), ELISA
 - ✓T: ELISA, ToBI



Método de la OMS: (OMS SIT 800, 1990; Adendo 2003 en prensa) -2

- El ensayo de dosis múltiples debe ser aún usado para:
 - Registro (consistencia de la producción): **negociar con la OMS** (evidencia clínica, epidemiológica)
 - Asignación de potencia a vacuna estándar
 - Estudios de estabilidad: **negociar con la OMS**



Ensayo de potencia de toxoides usando una sola dilución (OMS): Diseño

- El ensayo de una dilución se basa en los mismos principios para evaluar la respuesta que los ensayos de tres diluciones:
 - Selección de una dosis de toxoide estándar, expresada como una fracción de 30 o 40 UI (i.e., la potencia mínima por dosis sencilla humana), que da origen a un efecto protector convenido (e.g. 10%) en cobayos
 - Comparación de su efecto con la respuesta inducida por la misma fracción de una dosis sencilla humana de la vacuna de prueba



Iniciación del ensayo de una dilución

- Antes de iniciarlo, el laboratorio debe contar con evidencia :
 - De consistencia en la producción y en el ensayo de potencia
 - De regresión altamente significativa y justificación de los supuestos de linealidad y paralelismo de las curvas dosis-respuesta; estos supuestos no pueden probarse en el ensayo de una dilución
- Validación



Ensayo de potencia de toxoides usando una sola dilución (OMS): Evaluación

- Si la respuesta de la vacuna de prueba es significativamente mayor que la respuesta de la vacuna estándar ($P \leq 0.05$), la potencia de la vacuna es satisfactoria
- Si se usa la proporción de animales que responden satisfactoriamente, se puede emplear la Prueba Exacta de Fisher para establecer significancia estadística



La Prueba Exacta de Fisher

	EST	PBA	Total
(-)	16(a)	13(b)	29(n-)
(+)	0(c)	3(d)	3(n+)
<i>Total</i>	16(nR)	16(nT)	32(N)

$$\frac{n!n+!nR!nT!}{a!b!c!d!N!}$$

$$P = 0.11$$



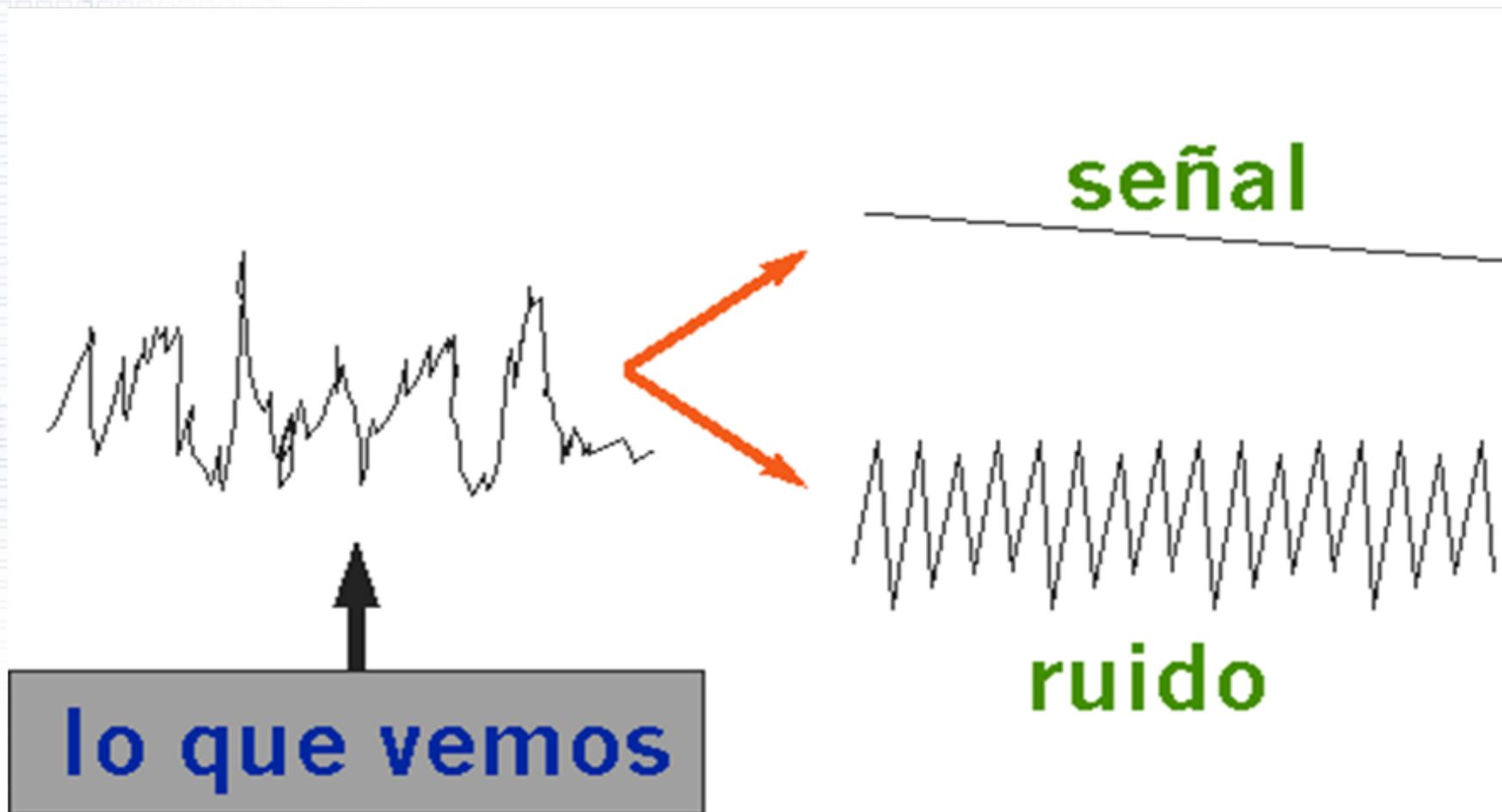


¿Cuántos animales por grupo?

- La respuesta depende de varios parámetros críticos:
 - La potencia verdadera (pero desconocida) de la vacuna de prueba
 - El límite de aceptación
 - La pendiente de la curva dosis-respuesta
 - El número de animales que mueren
- Por ejemplo, para una pendiente de 4 y 20 animales, un toxoide tetánico deberá tener 96.4 UI por dosis para que pase la prueba de una sola dilución, con 97.5% de confianza

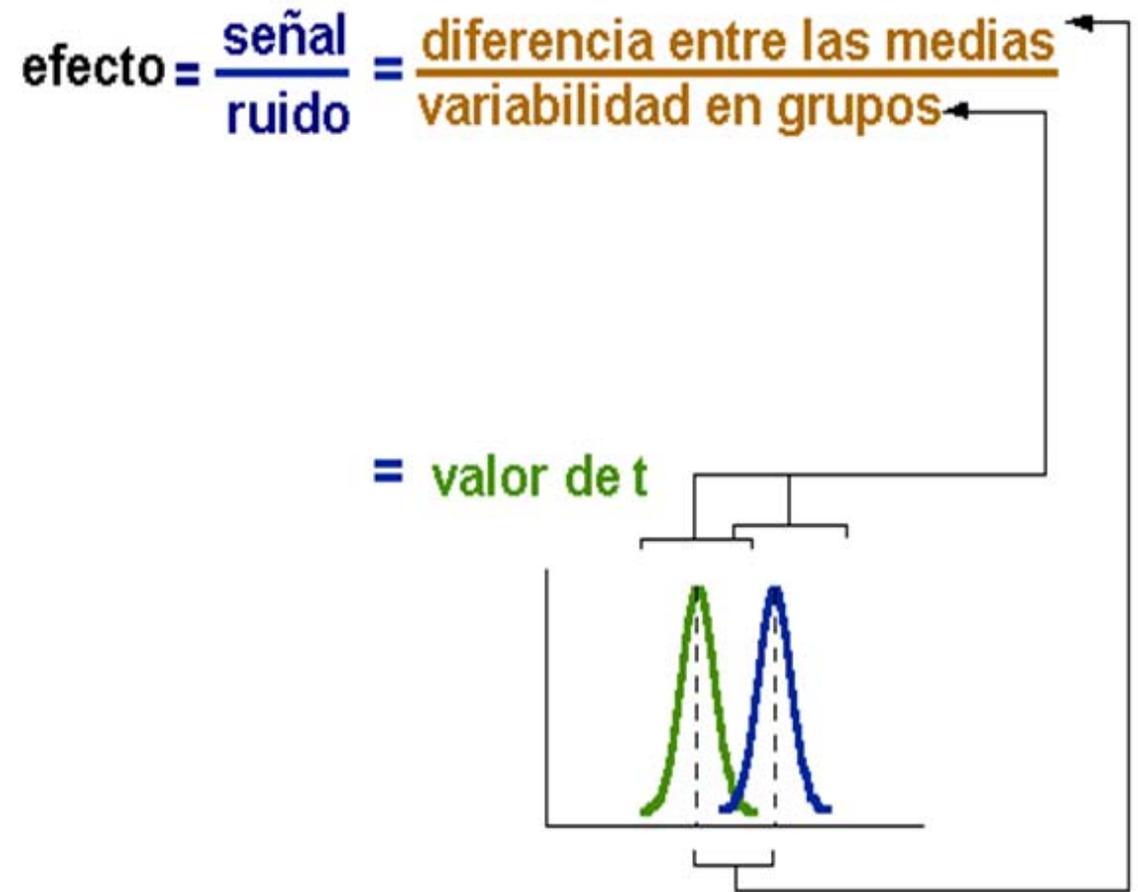


Lo que observamos se puede dividir



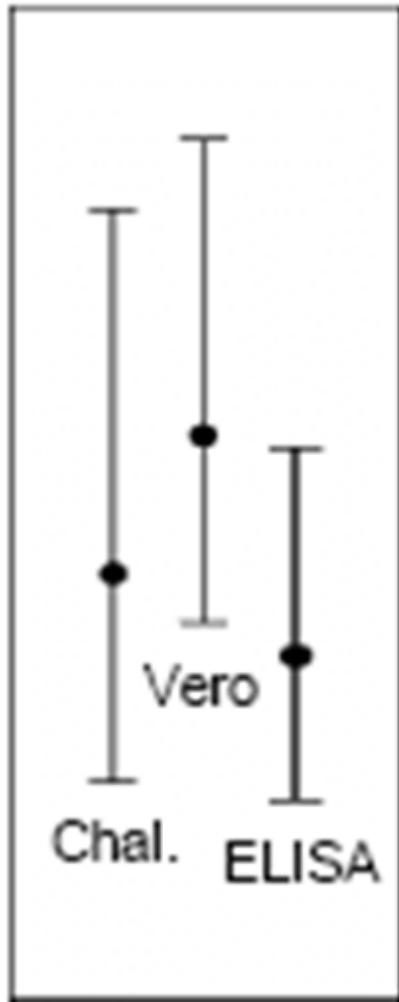


La prueba de t (Gosset = Student)





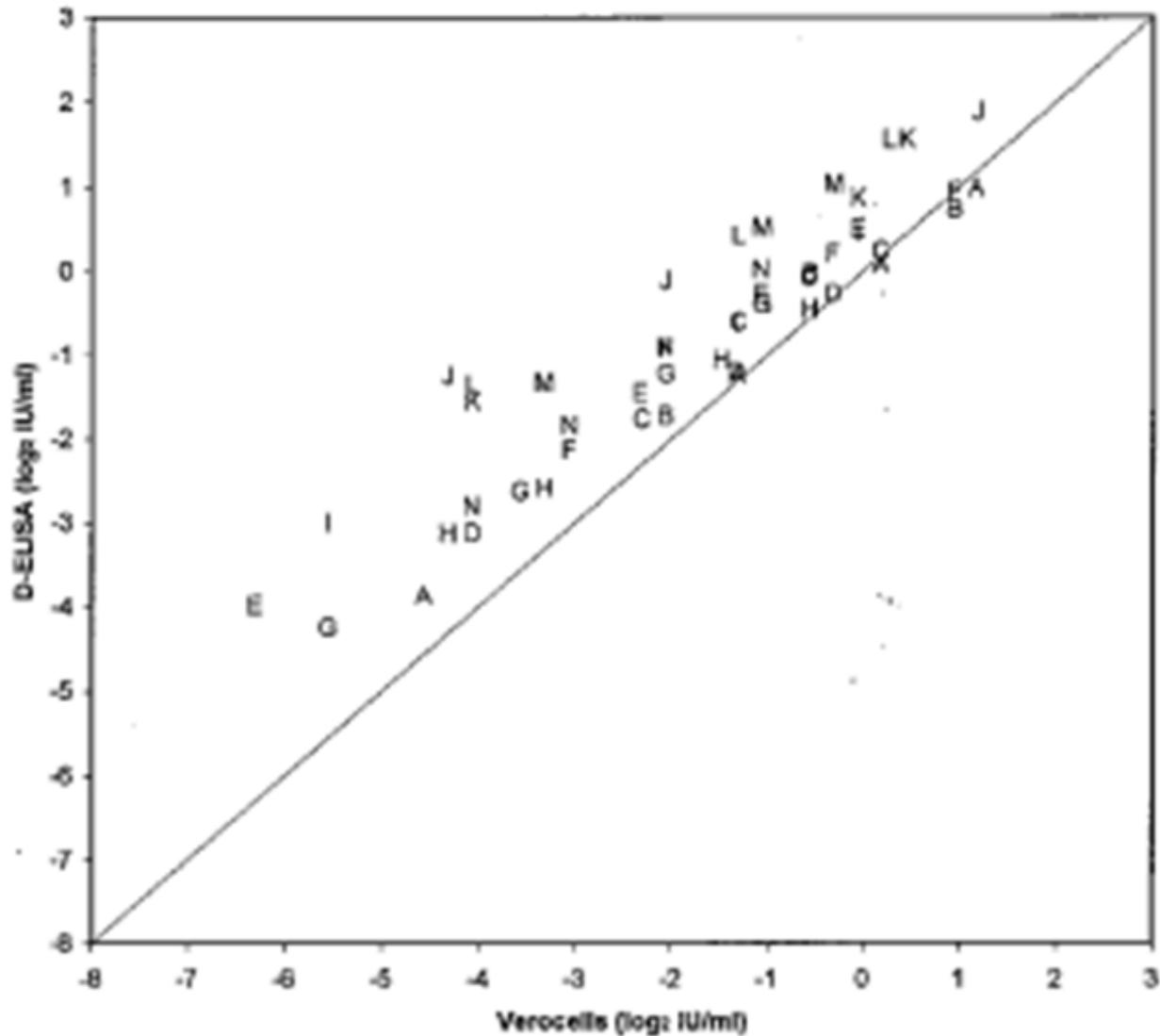
Precision de resultados de potencia de toxoide D por tres métodos (Daas, 2004)



- Los resultados de los 3 métodos (desafío, células Vero, ELISA) concuerdan ($p=0.299$)
- Los ensayos serológicos tienen mejor precisión, por lo que potencialmente son más poderosos en una prueba de una sola dosis: se pueden usar menos animales por grupo



Concordancia entre la potencia para D obtenida por ECV y ELISA





Posibles modificaciones a la prueba de los EUA con miras a la armonización



Inclusión de una vacuna de referencia

- Expresión de potencia en UI de toxoide /dosis sencilla humana:
 - Modificación sustantiva que puede requerir validación clínica; paso intermedio, inclusión de una vacuna de CONTROL



Definiciones

- Aunque un ESTANDAR y un CONTROL se incluyen en cada prueba de potencia, se usan de manera distinta:
 - **El CONTROL se usa para validar el ensayo; se establecen límites aceptables a su comportamiento**
 - **Se deben establecer límites semejantes para un ESTÁNDAR; sin embargo, una vez que el ensayo se ha juzgado válido, la potencia se expresa en términos RELATIVOS al estándar (se asignan unidades de actividad)**



Efecto de incluir una vacuna control

- Se puede incluir una vacuna **CONTROL**; sin embargo, el efecto neto es un incremento en el número de animales empleado:
 - **El mínimo actualmente es 14 por vacuna (6 inmunización + 4 titulación/1 nivel + 4 controles L+, 2 antígenos)**
 - **Si se incluye un control el número aumenta a 24 por vacuna (12 inmunización + 8 titulación/1 nivel + 4 controles L+; suponiendo que la misma dosis de prueba se puede usar para los dos antígenos, para ambas vacunas)**



Disminución de la dosis de inmunización

- Los Requisitos Mínimos indican que se debe emplear **no más** de $\frac{1}{2}$ dosis total humana (DTH); se pueden usar dosis más bajas
- Limitación: Los Requisitos Mínimos para Toxoide Tetánico indican que la vacuna no debe diluirse



Relación entre UI toxoide y respuesta en U de antitoxina

D, a partir de datos históricos (Jaramillo, 2004):

- Potencia (UI toxoide/0.5 mL) informada por los fabricantes (método OMS)
- Los mismos lotes probados por un método semejante al de los EUA (método Lr para medir antitoxina)
- Se analizaron 21 lotes de dT y 18 lotes de DTwP



Resultados

- Aproximadamente 145 UI (mediana) de toxoide D (in DTwP) indujeron ≥ 2 UI de antitoxina en 100% de los casos
- Aproximadamente 19 UI (mediana) de toxoide diftérico (en dT) indujeron ≥ 2 UI de antitoxina en 38% de los casos
- ¿Qué dosis entre 19 y 145 UI de toxoide diftérico induce ≥ 2 UI de antitoxina con mucha frecuencia?



Limitaciones de los resultados

- A la validez del análisis la limita la variabilidad del ensayo:
 - La potencia verdadera puede ser $\frac{1}{2}$ o 2 veces el estimado de una sola prueba
- Mientras que en un caso 8 UI de D indujeron ≥ 2 IU de antitoxina, 21 UI fueron incapaces de inducir esa respuesta



¿Solución?

- Inmunizar grupos de cobayos con varias dosis de toxoide D, cuya potencia se ha estimado con mucha precisión (e.g. una vacuna estándar)



Antitoxina inducida por T en el ensayo de potencia de los EUA (Hardegree, 1970)

Toxoide Adsorbido AlPO₃	Dosis (en 0.5 mL) Lf/UI	U/mL
C₁	5/99	>16
C₂	5/115	>10-<20



Relación entre dosis de T, protección y antitoxina en cobayos (Hardegree, 1970)

Toxoide	Dosis mL	S/D	%	UI/Dosis	Antitox U/mL
C ₁ (198)	0.02	48/48	100	3.96	0.0056
	0.01	43/46	94	1.98	0.0056
	0.005	35/46	76	0.99	0.001
	0.0025	17/48	35	0.50	<0.001
C ₂ (230)	0.02	34/34	100	4.6	0.0215
	0.01	33/35	94	2.3	0.0046
	0.005	31/34	91	1.15	0.00145
	0.0025	9/36	25	0.58	<0.001



Ensayo individual de sueros

- El ensayo individual de sueros se puede efectuar si se emplea un sistema diferente de prueba, e.g. Ensayo de Células Vero (ECV) para D:
 - Dosis alta, para medir concentraciones altas de antitoxina alrededor de 2 U/mL de suero
 - Dosis baja, para medir concentraciones bajas de antitoxina (método de la OMS); no se puede usar para medir concentraciones altas: mala concordancia de resultados con neutralización *in vivo*



Hacia la armonización

Método de los EUA (modificado)

- Dos grupos (Prueba y Control)
- Dosis más baja
- Prueba de los sueros individuales
- La potencia aún expresada en términos de la inducción de anticuerpos neutralizantes (U de antitoxin/mL de suero)

Método OMS de una dilución

- Dos grupos (Prueba y Estándar)
- Dosis baja
- Prueba de los sueros individuales
- Potencia expresada en términos de UI de toxoide por dosis sencilla humana (en relación a la vacuna estándar)