

Normalización y validación de ensayos inmunoenzimáticos para cuantificar IgG humana antileptospira serovares *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona mozdok*

Xenia Ferriol, Rolando Ochoa, Yoandra Rodríguez, Ana Margarita García, Martha González, Juan Carlos Martínez, Eric Estrada, Rosa Blanco, Franklin Sotolongo.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: xferriol@finlay.edu.cu

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune inducida por la vacuna cubana vax-SPIRAL se desarrollaron tres ELISAs de tipo indirecto para la cuantificación de IgG humana antileptospira, en el cual se emplearon como antígenos de captura las células enteras de *Leptospira interrogans* de los serovares *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona mozdok*, inactivadas con formaldehído y posteriormente desecadas a 33 °C durante 16-20 h en placas para ELISA. Para la cuantificación se empleó un suero estándar al que se le asignaron unidades arbitrarias, correspondientes al recíproco del título obtenido por microaglutinación (MAT). Estos fueron 31, 12 y 58 U/mL respectivamente para los tres serovares señalados que se incluyen en el preparado vacunal. Se utilizó un conjugado anti IgG humana-peroxidasa, el cual se une a los anticuerpos específicos contra cada serovar, la reacción se evidencia por la acción de la enzima sobre la mezcla sustrato-cromógeno (ortofenilendiamina) que genera color. El método normalizado se validó para los tres serovares; la precisión intra e interensayos fueron excelentes, con coeficientes de variación inferiores al 10%. Las desviaciones de la recuperación y linealidad fueron también inferiores al 10%. El suero control se ubicaron para los tres serovares en la zona de mayor interés para las muestras. Los ELISAs mostraron un 100% de sensibilidad para los tres serovares y se obtuvieron valores de 93,33% de especificidad para los serovares *canicola canicola* e *icterohaemorrhagiae copenhageni* y de 100% para el serovar *pomona mozdok*. El límite de detección para cada uno de los serovares fue de 0,478; 0,127 y 0,632 U/mL respectivamente.

Palabras claves: *Leptospira*, validación, ELISA, vax-SPIRAL

Introducción

La leptospirosis es una zoonosis, conocida también como enfermedad de Weil, fiebre canicola, entre otras; es un término que se aplica a la enfermedad causada por *Leptospira interrogans*. Los principales reservorios de leptospira son los roedores, cerdos, ganado vacuno y perros. En la infección humana las leptospiras penetran por la piel y mucosas que estén en contacto con orina, heces fecales y tejidos de animales infectados. Después de un período de incubación de 5 a 15 días la enfermedad comienza bruscamente, produciendo síntomas diversos, llegando incluso a producir la muerte del individuo si la enfermedad no se diagnostica rápidamente (1).

La transmisión está frecuentemente relacionada con algunas épocas del año, períodos de lluvias y regiones donde existe una alta densidad de población de reservorios animales. En Cuba, país tropical y con un alto grado de humedad relativa, la enfermedad se presenta durante todo el año y la prevalencia está asociada

principalmente con las actividades ocupacionales de riesgo como cultivadores de arroz y empleados de mataderos (1).

Un modo de prevenir esta enfermedad, es a través de la inmunización, tanto animal como humana, evitando de esta manera el posible contagio de la leptospirosis. Es por ello que el Instituto Finlay se dio a la tarea de desarrollar vax-SPIRAL, que es una vacuna para humanos para prevenir la enfermedad causada por *Leptospira interrogans*, específicamente por los serovares *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona mozdok*, que eran serovares que circulaban con más frecuencia en el país en el momento en que esta fue concebida¹. La producción de una vacuna contra la leptospirosis generó la necesidad de desarrollar una herramienta que permitiera medir lo más exactamente posible la respuesta de anticuerpos inducida por esta. Los

¹ R. Cruz. Comportamiento de la Leptospirosis en Cuba. Conferencia en Evento Internacional de Leptospirosis 2001, La Habana 17-18 de Mayo del 2001.

ELISAs reportados que utilizan como antígeno de recubrimiento el antígeno TR (resistente a temperatura) y género específico han sido usados frecuentemente y con gran éxito para el diagnóstico de la leptospirosis (2,3,4), pero no son satisfactorios para la evaluación de vacunas (5), por lo que fue necesario normalizar y validar un ELISA que cuantificara la respuesta de anticuerpos isotipo IgG producidos por la vacuna trivalente vax-SPIRAL. En el presente trabajo se describe la metodología empleada para lograr este objetivo.

Materiales y Métodos

Antígeno

Como antígeno de recubrimiento se usaron células de *Leptospira interrogans* de los serovares *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona mozdok*, cultivadas en la Planta de Producción del Instituto Finlay. Estas se inactivaron con formaldehído y se ajustaron a la concentración óptima. Como preservante se le añadió 0,1 mg/mL de timerosal. Estas células son las mismas que se emplean en la formulación de la vacuna cubana vax-SPIRAL.

Suero Estándar

Se preparó un suero estándar común para los tres ELISAs a partir de la mezcla de 10 sueros provenientes de individuos vacunados con vax-SPIRAL que presentaron altos títulos de anticuerpos por la prueba de microaglutinación (MAT), suministrados por el Laboratorio de *Leptospira* de la Vicepresidencia de Investigaciones del Instituto Finlay. A este suero se le asignaron unidades arbitrarias, definidas como el recíproco de los valores obtenidos por MAT para los tres serovares. Para determinar el rango de trabajo de cada curva de calibración, se prepararon series de diluciones dobles seriadas y se seleccionó el trayecto correspondiente a un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0,98 para un ajuste lineal de la curva respectivamente.

Suero Control positivo

Se tomó como suero control positivo una mezcla de sueros de individuos vacunados con vax-SPIRAL y se diluyó con albúmina de suero humano al 6%, de manera que su actividad de anticuerpos después de ajustada por el factor de calibración (200), oscilara entre los valores de actividad correspondientes al 3er y 4to puntos de la curva de calibración (zona de mayor pendiente). Se realizaron 80 evaluaciones para cada serovar y se determinó el rango del suero control por el cálculo del promedio de todas las réplicas \pm dos veces la desviación standard (DE), $\{X \pm 2DE\}$, previa determinación de la normalidad de

la distribución por la prueba de Kolmogorov Smirnov (6).

Para el procesamiento estadístico se empleó el programa computarizado Statgraphis[®] plus para Windows (6).

Procedimiento ELISA

Se sensibilizaron placas ELISA (COSTAR[®] Cat. N° 3590, Cambridge, Ma, USA) con 100 μ L por pocillo de células de *Leptospira interrogans* serovares *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona mozdok* previamente inactivadas con formaldehído. Se desecaron posteriormente a 33 °C durante 16-20 h (7). Las células no adsorbidas se eliminaron de la placa mediante cuatro lavados, con solución salina tamponada con fosfato (SSTF) y 0,05% (v/v) de Tween 20 (SSTF-T) usando un lavador de placas Denley, GB. El bloqueo se realizó con 150 μ L por pocillo de 3% (p/v) de leche descremada en SSTF y se incubó durante una h entre 20 a 25 °C. La solución se eliminó mediante sacudidas de la placa sobre papel de filtro y se añadieron el suero estándar, el control y las muestras. La curva de calibración se preparó con seis diluciones dobles seriadas del suero estándar en (SSTF-T) con 3% (p/v) de leche descremada (SSTF-TL) partiendo de una dilución 1:100. Los sueros a examinar se diluyeron 1:200 en la misma solución anterior. Cuando la actividad de anticuerpos obtenida fue mayor que el primer punto de la curva estándar para cada serovar, la muestra se repitió a una dilución 1:400. Se añadieron 100 μ L de cada dilución de la curva de calibración, el suero control y las muestras de suero a examinar por duplicado y se incubaron las placas a 37 °C durante una h. Después de lavar como se indicó anteriormente, se añadieron 100 μ L por pocillo de anti-IgG humana peroxidasa cadena γ específico (Sigma A8419, USA) en SSTF-TL y las placas se incubaron nuevamente a 37 °C durante una h. Después de lavar se añadió en cada pocillo 100 μ L de la mezcla sustrato-cromógeno (peróxido de hidrógeno 0,03%-OPD 1 mg/mL y buffer fosfato-citrato pH 5). Las placas se incubaron a temperatura ambiente entre 20 y 25 °C en la oscuridad por 30 min. Las absorbancias se midieron en un lector de placas (Anthos 2001, Labtec Instruments, Austria) a 492 nm.

Los valores de absorbancia se transformaron en U/mL con un programa computarizado desarrollado por el Centro para el Control de Enfermedades, Atlanta, USA (8), que utiliza la función logístico-log de cuatro parámetros para construir la curva de calibración. La validación y determinación cuantitativa de anticuerpos antileptospira serovares *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona mozdok*, se realizó con el paquete de programas ELISA (8).

Parámetros de normalización

Selección de:

- Concentración óptima de recubrimiento. Para ello se evaluaron concentraciones entre 0,2 y 300×10^6 células/mL (9).
- Dilución óptima de trabajo de las muestras y el conjugado. Se evaluaron diluciones para las muestras desde 1:25 hasta 1:250 y para el conjugado desde 1:5000 hasta 1:30000. (10,11).
- Tiempos de incubación: A temperatura de 37°C se evaluó una y dos h de incubación para la muestra y el conjugado (10,11).
- Diluciones de trabajo del suero control y el suero estándar (10,11).

Estos parámetros se seleccionaron teniendo en cuenta la mayor discriminación entre las muestras tomadas antes y después de la inmunización (T0 y T2), así como los valores de concentración del suero control y el estándar.

Parámetros de validación

a) Precisión

Se analizaron seis sueros con diferentes niveles de actividad de antileptospira *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona mozdok*. Se usó el coeficiente de variación (CV) para expresar las variaciones intra e interensayos. Se realizaron 10 réplicas de cada suero (precisión intraensayo) y para determinar la variación interensayos se realizaron tres ensayos para cada serovar en las mismas condiciones (8,9). Se consideraron óptimos los valores del CV inferiores al 10% para la precisión intraensayo e inferiores al 20% para la precisión interensayos (12,13).

b) Exactitud

La exactitud se estudió con una prueba de recuperación. Para ello se diluyeron 1:2 con un suero negativo otras seis muestras de sueros con altos, medios y bajos niveles de actividad de anticuerpos antileptospira *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona mozdok*. El valor esperado se definió como la mitad del valor de la muestra no diluida. La exactitud se expresó como el porcentaje entre el valor obtenido y el valor esperado ($[\text{valor obtenido} / \text{valor esperado}] \times 100\%$) (8, 9) y los valores óptimos deberían encontrarse entre el 90 y el 110% (12,13).

c) Evaluación de la curva estándar. Linealidad

La curva estándar se evaluó con un ensayo de paralelismo o dilución. Se tomaron cinco muestras de sueros con altos, medios y bajos niveles de actividad de anticuerpos antileptospira y se estudiaron en tres diluciones con SSTF-TL, cubriendo el rango de trabajo de

la curva estándar. Para evaluar el paralelismo se emplearon los CV entre los valores observados a estas diluciones luego de la corrección por el factor de dilución y el coeficiente de determinación (R^2) con los valores sin ajustar. El CV debió ser menor del 10% y el $R^2 > 0,98$ (12,13).

d) Límite de detección

Se realizaron 80 réplicas del blanco reactivo (SSTF-TL). El promedio más dos desviaciones estándar ($X+2DE$) se tomó como estimado del límite de detección.

e) Especificidad

Se empleó un panel de muestras reactivas a cada uno de los serovares de interés y otras negativas para todos ellos, preparadas mediante adsorción, para eliminar las posibles reacciones cruzadas. Se realizó el ELISA descrito para cada uno de los serovares y la especificidad se calculó como $E=(VN/VN+FP) \times 100$ donde VN correspondió a los valores negativos correctamente clasificados por MAT y FP corresponde a los falsos positivos (12,14).

Resultados

Se decidió utilizar como antígeno de recubrimiento o captura las mismas células que se emplean en la formulación de la vacuna y de esta manera medir más exactamente los anticuerpos estimulados por ella. En experimentos previos (datos no mostrados) se utilizó también como antígeno de recubrimiento una mezcla de los tres antígenos celulares componentes de la vacuna, pero esto no permite explorar de manera individual la respuesta a cada uno de los serovares componentes; por este motivo se normalizaron tres ELISAs y aunque hace más engorroso el proceso, se mide la respuesta de anticuerpos producida contra cada uno de los antígenos componentes de vax-SPIRAL. Se seleccionó como concentración óptima de recubrimiento 200×10^6 células/mL correspondiente a la zona de meseta de mayor señal obtenida con los sueros estándar y control (11). Las diluciones de trabajo de las muestras y el conjugado fueron 200 y 15 000 respectivamente, siendo estos valores los óptimos, donde la relación T2/T0 de las muestras y entre los sueros estándar y control fue mayor permitiendo discriminar si la respuesta de anticuerpos producida se debía a la administración de la vacuna o a la existencia de anticuerpos circulantes por previa exposición del individuo a la bacteria. Formó parte de la normalización de los ELISAs la selección del suero estándar y suero control. Al suero estándar se le asignaron unidades arbitrarias correspondientes al recíproco de la MAT; que fueron: 31, 12 y 58 U/mL para *canicola canicola*, *Icterohaemorrhagia copenhageni* y *pomona mozdok* respectivamente. Con este suero se preparó la curva de calibración que partió de una dilución

inicial de 1:100 para los tres serovares, a partir de la cual se realizaron diluciones dobles seriadas; se calculó el (R^2) y se seleccionaron curvas de calibración para los tres serovares de seis puntos que presentaron un (R^2) cercanos a 1 (Tabla 1).

Tabla 1 Coeficiente de determinación obtenido para las curvas de calibración de los tres ELISAs.

Serovar	R^2
<i>Canicola canicola</i>	0,9907
<i>Icterohaemorrhagiae copenhageni</i>	0,9888
<i>Pomona mozdok</i>	0,9949

En el caso del suero control se determinó la normalidad de la distribución empleando la prueba de Kolmogorov Smirnov y por este método se demostró que el suero control tenía una distribución normal para los tres ELISAs ($p > 0,05$); el rango de este suero fue: 6,4733 a 8,1917 U/mL para *canicola canicola*; 2,4692 a 2,8754 U/mL para

icterohaemorrhagiae copenhageni y 13,256 a 17,290 U/mL para *pomona mozdok*. Se estableció como criterio de calidad del ensayo el rango del suero control si los valores obtenidos para este no se encontraran dentro del rango para cada serovar el ensayo deberá repetirse. El hecho de utilizar un único suero estándar y suero control para los tres ELISAs facilita el procedimiento técnico.

Una vez normalizados los ELISAs, seguidamente se procedió a la validación de los mismos.

La precisión indica la dispersión de los resultados de una muestra procesada varias veces en el mismo ensayo (precisión intraensayo) y en diferentes ensayos (precisión interensayo). Las variaciones intraensayos (CV) obtenidas para los tres ELISAs estuvieron por debajo del 10% (Tabla 2), por lo que se encontraron dentro del criterio de aceptación para la precisión intraensayo (12,13).

Tabla 2. Precisión intraensayo

S	<i>Canicola canicola</i>				<i>Icterohaemorrhagiae copenhageni</i>				<i>Pomona mozdok</i>									
	Mtras	Placa 1		Placa 2		Placa 3		Placa 1		Placa 2		Placa 3						
N=10	X	CV	X	CV	X	CV	X	CV	X	CV	X	CV	X	CV	X	CV	X	CV
1	40,4	3,39	41,55	5,62	45,29	5,95	14,91	4,17	14,24	3,55	13,89	5,49	64,24	8,27	68,02	5,88	75,15	6,67
2	22,28	4,67	22,56	3,16	23,14	4,25	7,81	4,59	7,83	3,05	8,06	2,91	33,24	2,98	36,43	4,81	38,25	11,74
3	11,87	2,81	11,73	5,73	12,14	3,63	4,14	2,78	4,11	3,61	4,12	4,43	17,24	4,43	18,46	3,86	19,18	3,81
4	5,518	3,33	5,46	4,02	5,88	3,07	1,85	2,09	1,77	5,03	1,83	3,65	7,90	3,31	8,43	4,41	9,17	3,62
5	3,083	4,55	2,94	2,84	3,34	8,44	1,05	4,15	0,98	3,29	1,02	4,61	4,54	5,71	4,34	6,44	4,85	4,04
6	1,549	6,55	1,50	5,70	1,60	6,41	0,56	3,34	0,51	4,80	0,52	6,87	2,63	3,36	2,33	9,73	2,60	4,95

S: Serovar N: número de réplicas Mtras: muestras X: Promedio de las réplicas (U/mL) CV: coeficiente de variación

Lo mismo ocurrió para la precisión interensayos (Tabla 3), donde se obtuvieron valores de CV para los tres ELISAs por debajo del 10%, cuando para este tipo de ensayo

tiene como criterio de aceptación valores de hasta 20%. Estos resultados garantizan una excelente repetibilidad y reproducibilidad (12,13).

Tabla 3. Precisión interensayos

Serovar	<i>Canicola canicola</i>			<i>Icterohaemorrhagiae Copenhageni</i>			<i>Pomona mozdok</i>		
	N=30	X	DE	CV	X	DE	CV	X	DE
1	42,40	3,01	7,09	14,34	0,75	5,23	71,25	5,52	7,751
2	22,66	0,96	4,25	7,94	0,29	3,68	37,01	2,88	7,79
3	11,91	0,52	4,33	4,12	0,15	3,55	18,77	0,77	4,12
4	5,62	0,27	4,73	1,81	0,07	4,11	8,63	0,50	5,79
5	3,12	0,25	7,92	1,02	0,05	4,72	4,56	0,32	7,07
6	1,55	0,10	6,59	0,53	0,03	6,19	2,41	0,21	8,52

N: número de réplicas X: Promedio de las réplicas DE: desviación estándar CV: Coeficiente de variación

La exactitud medida por la prueba de recuperación o recobrado del sistema también mostró excelentes resultados, con un promedio de la recuperación (%) de 99,115, 99,79 y 104,61 para los ELISAs de *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona*

mozdok respectivamente (Tabla 4). Esto confirma la gran exactitud de los tres sistemas ya que todos los valores se encontraron en el intervalo de recuperación considerado como óptimo (12,13).

Tabla 4. Recuperación

Serovar	<i>Canicola canicola</i>			<i>Icterohaemorrhagiae copenhageni</i>			<i>Pomona mozdok</i>		
	X1	X2	% R	X1	X2	% R	X1	X2	% R
1	57,50	56,94	99,03	19,39	19,24	99,23	108,3	110,2	101,75
2	38,20	35,12	91,94	12,20	11,38	93,28	68,6	62,7	91,40
3	24,02	25,62	106,66	7,80	8,34	106,92	23,8	22,84	95,97
4	13,30	15,14	113,83	3,97	4,48	112,85	26,0	28,94	111,30
5	6,80	6,16	90,59	2,18	1,98	90,82	11,8	12,8	108,47
6	2,85	2,63	92,28	0,94	0,90	95,74	4,5	4,68	104

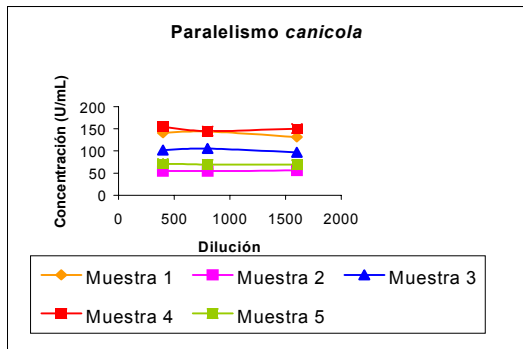
X1: Promedio de las réplicas de los valores esperados para cada muestra obtenidos para cada muestra

X2 : Promedio de las réplicas de los valores esperados para cada muestra

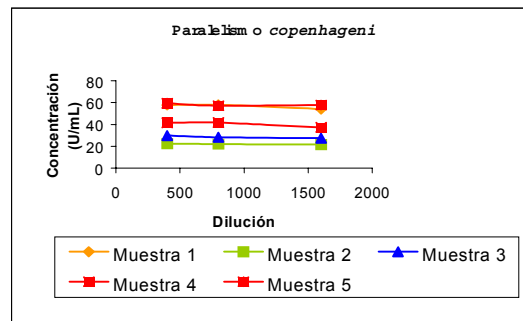
% R: Porcentaje de recuperación

Figura 1. Prueba de paralelismo (a, b, c)

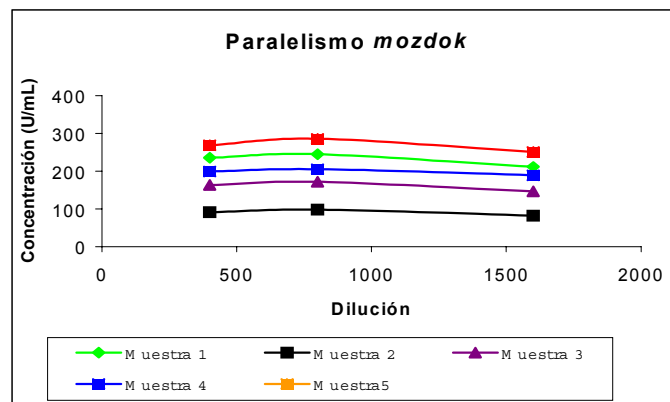
a)



b)



c)



La prueba de paralelismo mostró el CV por debajo del 10% para los tres serovares y para la mayoría de las muestras se obtuvieron CVs por debajo del 5%, por lo que se puede afirmar que la curva es confiable en todos los puntos evaluados, siendo independiente el valor de actividad de anticuerpos de cada muestra de la dilución de trabajo utilizada (Figura 1a-c). El valor de R^2 para todas las muestras y para los tres serovares estuvo por encima de 0,99, lo cual demuestra la linealidad de la relación dosis respuesta en el rango de trabajo seleccionado.

El límite de detección obtenido para cada uno de los tres serovares fue: 0,478; 0,127 y 0,632 U/mL para *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona mozdok* respectivamente, lo cual indica la actividad de anticuerpos mínima detectable por cada ELISA, teniendo en cuenta el valor asignado al suero estándar.

El ensayo de especificidad tuvo como objetivo demostrar que cada ELISA es específico para el serovar de la célula con que se recubrió la placa. Como vax-SPIRAL es una vacuna trivalente y se conoce la existencia de antígenos comunes entre serovares relacionados (1), podrían presentarse reacciones cruzadas, por lo que para explorar la especificidad se absorbieron los sueros con las células correspondientes. Se demostró que el método era capaz de determinar el analito para el cual estaba diseñado y se obtuvo como resultado 100% de sensibilidad para las tres serovariantes y 93,33% de especificidad para *canicola canicola* e *icterohaemorrhagiae copenhageni* y 100% para *pomona mozdok*.

Estos ELISAs presentaron una apropiada precisión y exactitud y han sido de gran utilidad para la evaluación de la respuesta inmune contra la vacuna cubana vax-SPIRAL. Otra aplicación posible sería en estudios seroepidemiológicos y para explorar la respuesta a cada uno de los serovares componentes de la vacuna y de esta manera conocer el nivel de circulación en la población.

Los principios básicos de estos ELISAs podrían ser aplicados a otros serovares de *Leptospira interrogans*.

Referencias

- González M, Naranjo M, Rodríguez Y, Bebelagua Y, Oliva R, Batista N, González I, Izquierdo L y Sierra G. Vacuna antileptospirósica Trivalente adsorbida para Uso Humano. Primer ensayo evaluativo de reatogenicidad e inmunogenicidad en un grupo de voluntarios adultos. *VacciMonitor*. 1997; 6(12):2-10.
- Jmazzone J, Dorta G de Mazzone, Mailloux M. Antigene thermoresistant chez les leptospires. *Ann. Microbiol.* 1974;125A, 125-126.
- Terpstra, *et al.* ELISA for detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *J. Gen. Microbiol.* 1985; (131):377-385.
- Terpstra, *et al.* Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Zentralblatt Bakt Hyg Abt I Orig.* 1980; 247:400-405.
- Martínez R.S, *et al.* Reactogenicidad e Inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la Leptospirosis humana. *Rev. Cubana Med Trop.* 1998; 50 (2):159-166.
- STATGRAPHICS Plus for WINDOWS [computer program]. Version 3.1. Statistical Graphics Corp, USA, 1998.
- Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X, Blanco R, *et al.* Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor*. 2000; 9 (1):17-20.
- Plikaytis B D, Carlone G M, Turner S H, Gheesling L L, Holder P F. Program ELISA user's manual. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 1993.
- Stenitz M, Baraz L. A rapid method for estimating the binding of ligands to ELISA microwells. *J Immunol Meth.* 2000; 238:143-150.
- Tijssen P. Outline of the strategies for enzyme immunoassays. In: Burdon RH, Van Knippenberg PH editors. *Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and theory of enzyme immunoassays*, Amsterdam, London, New York, Tokyo, Elsevier, 1993:9-20
- Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM Blanco R, *et al.* Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor* 2000; 9(3):13-18.
- Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R, *et al.* Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor*. 1999; 8(10):9-13.
- Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. *Validation of analytical assays*. WHO Geneva, 1997:65-95.

Standardization and validation of immunoenzymatic assays for the quantitative determination of human IgG-class antibodies to leptospira canicola canicola, icterohaemorrhagiae copenhageni and pomona mozdok

Abstract

Indirect ELISAs for the quantitative determination of human IgG-class antibodies to leptospira were developed for the evaluation of the immune response elicited by vax-SPIRAL. Whole cells of *Leptospira interrogans*, serovars *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* and *pomona mozdok* were used as capture antigens. The formaldehyde-inactivated cells were dried at 33 °C between 16-20 hours on ELISA plates. The units of the standard serum were assigned according the inverted microagglutination titres, and were 31, 12 and 58 U/mL respectively. An anti-human IgG class / HRPO conjugate was employed for the detection of antibodies to leptospira, then the chromogenic substrate (H₂O₂-orthophenilendiamine) is hydrolyzed by the enzyme of the conjugate, and the intensity of the color is proportional to the antibody concentration in the sample. The intra and interassay precision studies achieved variation coefficients below 10%. The deviations of the recovery and linearity tests were below 10% also. The control serum was located according the samples. The sensitivity was 100% for all serovars, and the specificity was 93,33% for the serovars *canicola canicola* and *icterohaemorrhagiae copenhageni*, and 100 % for *pomona mozdok*. The detection limits were 0.478, 0,127 and 0,632 U/mL respectively.

Keywords: *Leptospira interrogans*, validation, ELISA, vax-SPIRAL.