

Introducción de un ELISA como ensayo alternativo en la determinación de la potencia de vacunas antitetánicas

Juan Carlos Ramírez, Esther María Fajardo, Beatriz Romeu, Ubel Jesús Ramírez, Eduardo Álvarez, Rolando Ochoa, Alicia Perojo, Regla Sosa, Deolinda Silva, Irma Labrador, Adina García, Pablo González, Luis Izquierdo.

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

E-mail: jcramirez@finlay.edu.cu

Por más de medio siglo de uso, la vacunación con el toxoide tetánico ha mostrado un elevado porcentaje de eficacia en la prevención del tétanos. Este trabajo pretende introducir un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) como método alternativo a la prueba de seroneutralización *in vivo* utilizada en la evaluación de la potencia de las vacunas antitetánicas. Se desarrolló un ELISA de tipo indirecto para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero de curiel a partir de un estándar con 29 UI/mL, previamente calibrado. Se determinó la precisión, exactitud y linealidad del ensayo. Se analizó la correlación entre el ELISA y la prueba biológica mediante la evaluación de un total de 75 muestras de sueros por ambos métodos. Por último, se estudió la respuesta individual de un grupo de animales contra 15 lotes de toxoide tetánico. El ensayo demostró ser preciso y exacto, con imprecisiones inferiores al 20% y valores de recuperación entre el 90–110%. Las desviaciones del paralelismo mostraron coeficientes de variación alrededor del 10%. El análisis por regresión lineal mostró una buena correlación entre el ELISA y el ensayo biológico ($R^2 = 0,989$). El método alternativo desarrollado probó ser una herramienta útil para la determinación de la potencia de vacunas antitetánicas a partir de la evaluación independiente de la respuesta de cada animal contra el toxoide tetánico. Los niveles de seroprotección alcanzados se encontraron entre el 83–100%.

Palabras clave: ELISA, métodos alternativos, ensayos *in vitro*, toxoide tetánico.

Introducción

Estudios dirigidos a la determinación de la seguridad de un nuevo y potencial producto farmacéutico antes de su primera administración a humanos, antes de realizar pruebas terapéuticas en poblaciones extensas, y por último, antes de ponerlo en el mercado, constituyen una necesidad científica y ética. Más de 10 millones de animales son usados anualmente en todo el mundo para el desarrollo, producción y control de la calidad de inmunobiológicos, de los cuales cerca del 20% son empleados en el desarrollo de nuevos productos o mejora de los ya existentes, y aproximadamente el 80% restante en los ensayos de rutina de control de la calidad de productos terminados (1, 2).

Cuestionamientos éticos sobre el cuidado y protección de los animales, así como

consideraciones prácticas vinculadas a su uso, requieren que el empleo de los animales de laboratorio sea limitado, lo cual justifica la utilización de métodos complementarios o alternativos, según el principio de las “Tres Rs” (3). Este principio plantea el empleo de técnicas que reemplacen el uso de animales, que reduzcan la cantidad empleada, o que refinen un método existente para disminuir el malestar en los animales (4), sin que esto afecte el nivel de información obtenido en los estudios *in vivo* tradicionales (5). Dentro de estas, los modelos *in vitro* son uno de los más eficientes para la reducción y/o reemplazamiento del uso de animales de laboratorio (2, 6, 7).

El tétanos, causado por la acción de la toxina tetánica, constituye la tercera causa de muerte a nivel mundial entre las enfermedades inmunoprevenibles. La toxina inactivada (toxoides)

es usada como vacuna en la inmunización de niños y adultos desde mediados del pasado siglo (8).

Los niveles de antitoxina tetánica pueden ser medidos por métodos *in vivo* o *in vitro*. Las pruebas de neutralización miden directamente la actividad biológica de la antitoxina en animales de laboratorio; estas son sensibles y específicas, sin embargo son caras, requieren personal entrenado, mucho tiempo, un gran número de animales y provocan en estos severos diestres (9).

Por otra parte, la interacción entre la antitoxina tetánica y la toxina o el toxoide puede ser medida por ensayos *in vitro*, tales como: hemoaglutinación pasiva (10, 11, 12), ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA) (13, 14, 15, 16), ensayos de inhibición con toxina (17), radioinmunoensayos (18) e inmunoensayos fluorométricos (19, 20). Estas técnicas son simples, sensibles, rápidas y menos caras que el ensayo biológico (21, 22, 23).

De esta forma, nos propusimos introducir un ELISA indirecto para la cuantificación de antitoxina tetánica como procedimiento alternativo al método *in vivo* tradicional, actualmente empleado en la evaluación de la potencia de vacunas antitetánicas.

Materiales y Métodos

Inmunorreactante

Como antígeno de captura se usó toxoide tetánico estéril altamente purificado, producido en el Instituto Finlay, lote No. P-006/00, con 1200 Lf/mL (unidades de floculación por mL) y con una pureza antigénica de 1573 Lf/mg de nitrógeno proteico. Al mismo se le añadió azida sódica al 0,2% (p/v) como preservante, fue dispensado en alícuotas de 350 μ L y conservado a 4 °C.

Suero estándar antitoxina tetánica

Se empleó como estándar en la curva de calibración del ELISA la mezcla de los sueros

antitetánicos de 20 curieles. Este suero patrón fue previamente calibrado por el ensayo de neutralización *in vivo* y ajustado a 29 UI/mL con suero de curieles no inmunizados. Posteriormente

se le añadió azida sódica al 0,2% (p/v), fue dispensado y almacenado a -20 °C.

Ensayo ELISA

Se sensibilizaron placas ELISA (NUNC Maxisorp, 439454) con 100 μ L por pocillo de toxoide tetánico a una concentración de 2 Lf/mL en solución amortiguadora carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. La placa se incubó durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. El toxoide no adsorbido se eliminó lavando la placa cuatro veces con 300 μ L por pocillo de solución de lavado, Tween 20 al 0,05% en agua destilada. La curva de calibración se preparó a partir de 5 diluciones dobles seriadas, desde 1/400 hasta 1/6400, del suero antitetánico estándar obtenido en curiel. La dilución de trabajo para las muestras de sueros fue de 1/800 y de 1/3200 según los animales hubiesen recibido una o dos dosis del toxoide. Todas estas diluciones se realizaron en solución amortiguadora de fosfatos pH 7,4 (PBS) con leche descremada al 3% (p/v).

Se adicionó 100 μ L por pocillo de las muestras y el estándar. La placa se incubó a 37 °C durante 1 h en cámara húmeda. Después de lavada, se aplicó 100 μ L por pocillo de conjugado anti-IgG de curiel/fosfatasa alcalina (Sigma A-5062), a una dilución de 1/15000, en PBS con leche descremada al 3% (p/v). Nuevamente la placa fue incubada a 37 °C durante 1h en cámara húmeda y lavada. A continuación se añadió 100 μ L por pocillo de p-nitrofenilfosfato de sodio (Sigma 104-105) a 1 mg/mL en solución de dietanolamina pH 9,8. La placa fue incubada durante 30 min a 20-25 °C en la oscuridad, y se detuvo la reacción con 50 μ L por pocillo de NaOH 2N. Las absorbancias se midieron a 405 nm en un lector de placas Labsystems Multiskan.

La concentración de antitoxina tetánica de los sueros se determinó transformando los valores de absorbancias a UI/mL; se utilizó la función logístico-log de cuatro parámetros para construir la curva de referencia a partir de las diluciones del estándar. El cálculo se efectuó empleando el programa ELISA, desarrollado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (24, 25).

Estandarización

En la estandarización del ELISA se analizaron los indicadores: precisión, exactitud y linealidad.

Para la determinación de estos parámetros se estudiaron 6 muestras de suero, con valores de antitoxina tetánica que cubrían todos los segmentos del rango analítico de la curva de calibración.

a) Precisión

Se analizaron 10 réplicas de cada suero a una dilución de 1/800 durante tres días consecutivos. El coeficiente de variación (CV) se empleó para expresar las variaciones en la precisión del ensayo. La precisión interensayos se determinó a partir de la media de los valores de actividad antitetánica de cada una de las muestras, para cada uno de los ensayos. En el cálculo de la precisión total del ensayo se tuvieron en cuenta los valores obtenidos para cada réplica de las muestras en los tres ensayos (26, 27).

b) Exactitud

La exactitud del método se estudió aplicando una prueba de recuperación, la cual se determinó a través de la relación: (valor obtenido/ valor esperado) x 100%. Las muestras originales y las diluidas 1/2 con suero negativo, se analizaron independientemente a una dilución de 1/800; ensayándose cuatro réplicas por muestra. El valor esperado se definió como la mitad del obtenido para la muestra original (no diluida). Este resultado se corroboró analizando los valores obtenidos y esperados por el procedimiento t de Student para muestras apareadas (26, 27).

c) Linealidad

La curva de calibración se evaluó a través de un ensayo de paralelismo o dilución. Tres diluciones seriadas (1/800, 1/1600 y 1/3200) de cada muestra se evaluaron por triplicado. El CV de la concentración, previa corrección con el factor de dilución, fue usado para determinar el paralelismo. Para confirmar la linealidad de la curva estándar se calculó su coeficiente de determinación a partir de los valores obtenidos para cada dilución de la misma (26, 27).

Ensayo de neutralización en ratón

El ensayo de seroneutralización in vivo se desarrolló en ratones Balb/c del mismo sexo de 16 a 18 g de peso. Se utilizaron 30 animales por cada suero problema y otros 30 para el patrón de antitoxina tetánica de referencia previamente

calibrado contra un estándar de la OMS (28).

Se prepararon 5 diluciones del suero patrón antitetánico y de cada lote de suero en estudio, a las cuales se les añadió volúmenes fijos de una toxina tetánica estándar de actividad conocida. Una vez mezclados fueron incubados durante 1 h a 20–25 °C. Transcurrido este tiempo, por cada mezcla antisuero-toxina se inocularon 6 ratones a razón de 0,5 mL por vía subcutánea. Las observaciones se realizaron a las 24, 48, 72, 96 y 120 h posteriores a la inoculación.

El cálculo de la potencia de cada lote de vacuna se realizó por el método de Spearman y Karber, asignándole a estos los valores de actividad (UI/mL) de la antitoxina patrón a partir de la relación entre el por ciento de mortalidad y de sobrevivencia del estándar y la muestra problema (9, 29).

Correlación entre el ELISA y el ensayo de seroneutralización

Para establecer la correspondencia entre el ELISA y el ensayo de neutralización en ratón, se estudiaron por ambos métodos 75 mezclas de sueros obtenidos a partir de la inmunización de curieles con una o dos dosis de 0,5 mL, correspondientes a un igual número de lotes de vacuna antitetánica producidos en el Instituto Finlay. Los sueros individuales de los 6 curieles inoculados por lote de antígeno fueron mezclados en partes iguales para su análisis.

Los valores de actividad antitoxina tetánica obtenidos por ambos ensayos se sometieron a un análisis de regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados, considerando la prueba de seroneutralización como variable independiente. La ecuación de mejor ajuste, y los coeficientes de determinación (R^2) y de correlación (R) fueron calculados. Para verificar el ajuste lineal de la regresión se realizó un ANOVA, y los valores de antitoxina obtenidos por cada método se compararon por la prueba t de Student para datos apareados (16).

Aplicación técnica

Se evaluaron mediante el ELISA, descrito anteriormente, las muestras individuales y la

mezcla de los sueros de 6 curieles inmunizados con una dosis humana de toxoide tetánico (0,5 mL a 20 Uf/mL), para un total de 15 lotes de vacunas. Se calculó la media geométrica y el intervalo de confianza al 95%, previa transformación logarítmica de los valores de actividad de antitoxina tetánica, para cada grupo de muestras. Se determinó el por ciento de seroprotección inducido por cada lote de antígeno a partir de la sustitución, en la ecuación de ajuste de la regresión, del límite de aceptación establecido para el ensayo biológico (2 UI/mL) (9, 29).

Resultados y Discusión

El método tradicional aceptado por las autoridades regulatorias para la determinación de los títulos de antitoxina tetánica en sueros de animales o humanos, inmunizados con toxoide tetánico es el ensayo de seroneutralización *in vivo*. El mismo se basa en la propiedad neutralizante del suero sobre dosis conocidas de toxina tetánica, la cual al quedar libre se detecta en animales. Sin embargo, a pesar de la elevada sensibilidad de este ensayo, resulta muy engorroso y presenta varios inconvenientes (9, 29).

En las últimas décadas, varios autores han descrito métodos *in vitro* para la determinación de los niveles de antitoxina tetánica presentes en suero o plasma usados en estudio de inmunidad contra tétanos (10, 11, 13, 16, 17, 18, 30, 31, 32). Sin embargo, algunos de estos ensayos detectan no solamente los anticuerpos neutralizantes, por lo que las pruebas *in vivo* deben ser usadas para calibrar y verificar métodos *in vitro* destinados al uso rutinario (3, 33).

Dentro de los métodos *in vitro*, el ELISA ha mostrado ser una técnica muy útil, pues presenta una alta sensibilidad y permite la cuantificación de antitoxina tetánica en una gran cantidad de muestras de suero, de forma rápida y con bajos costos. Además, resultados obtenidos por ELISA han mostrado una buena correlación con aquellos alcanzados a través del tradicional ensayo

biológico (13, 33, 34). Desarrollamos entonces un ELISA indirecto como método alternativo al ensayo biológico tradicional para la evaluación de la potencia de vacunas antitetánicas.

Estandarización

Los ensayos propuestos como alternativa al uso de los métodos tradicionales requieren de una adecuada consistencia en sus resultados, lo cual está determinado por la apropiada estandarización y validación del método. Ambos procesos son indispensables e imprescindibles para lograr óptimos resultados y alcanzar la aceptación e introducción de estos ensayos (27, 35, 36, 37).

a) Precisión

Como puede apreciarse en la Tabla 1, los CV obtenidos para la precisión intraensayo se ubican entre el 2,8–16,4%. La mayoría de los cuales (83,3%) fueron inferiores al 10%, con solo tres coeficientes de variación por encima de este valor (13,3, 14,5 y 16,4%). Por su parte, los CV interensayos alcanzados se hallan por debajo del 10%, incluso M2 que fue la que presentó mayores variaciones intraensayos, es la que exhibe una menor variación intermedia, lo cual indica que mayores variaciones en la repetibilidad no se corresponden necesariamente con mayores imprecisiones entre ensayos. Finalmente, los resultados de la precisión total del ensayo mostraron solo dos valores por encima del 10% (12,8 y 13,1%), los cuales coinciden con aquellas muestras (M1 y M2) que obtuvieron mayores coeficientes de variación intraensayo.

Los valores obtenidos demuestran que el ELISA desarrollado por nuestro laboratorio presenta una buena repetibilidad y precisiones interensayos y total. Esta disminución de la variabilidad de los resultados constituye una ventaja importante de los métodos *in vitro* frente a los ensayos *in vivo*. Nuestros resultados están en concordancia con los alcanzados por otros autores para ELISA similares, diseñados como métodos alternativos a pruebas biológicas existentes (16, 34, 38, 39).

Tabla1. Precisión del ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica

Muestras	Ensayo 1 (n = 10)		Ensayo 2 (n = 10)		Ensayo 2 (n = 10)		Precisión Inter- ensayos (n = 3)		Precisión Total (n = 30)	
	X	CV	X	CV	X	CV	Xi	CV	Xt	CV
	(UI/mL)	(%)	(UI/mL)	(%)	(UI/mL)	(%)	(UI/mL)	(%)	(UI/mL)	(%)
M1	56,9	8,5	62,4	14,5	68,9	8,2	62,7	9,6	62,7	13,1
M2	42,9	8,2	42,2	16,4	40,6	13,3	41,9	2,8	41,9	12,8
M3	27,8	6,6	24,6	9,2	24,4	6,7	25,6	7,5	25,6	9,5
M4	9,7	4,2	8,9	4,5	9,3	7,6	9,3	4,3	9,3	6,7
M5	7,1	4,2	7,0	3,3	6,5	7,4	6,9	4,7	6,9	6,4
M6	5,3	2,8	4,8	4,2	5,1	3,5	5,1	5,0	5,1	5,9

X: Promedio de las réplicas

Xi: Promedio de las medias de cada ensayo

Xt: Promedio de las réplicas de todos los ensayos

CV: Coeficiente de variación

Tabla 2. Exactitud del ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica

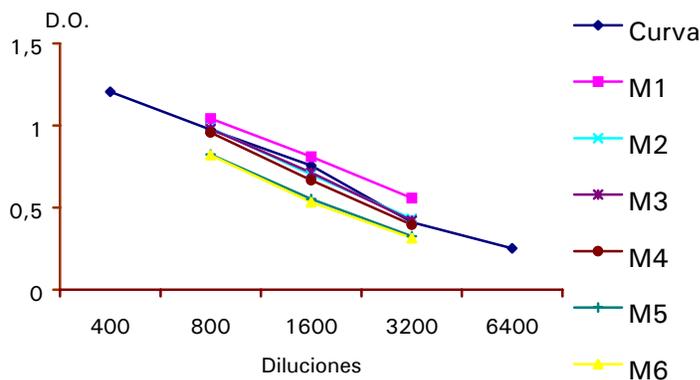
Muestras	VR (UI/mL)	VE (UI/mL)	VO (UI/mL)	Recuperación (%)
M1	37,8	18,9	20,8	110,1
M2	32,4	16,2	16,0	98,8
M3	22,4	11,2	11,0	98,2
M4	20,4	10,2	9,9	97,1
M5	15,8	7,9	7,6	96,2
M6	13,1	6,6	5,8	88,6

VR: Valor real u original

VO: Valor obtenido

VE: Valor esperado

CV: Coeficiente de variación



Muestras	M1	M2	M3	M4	M5	M6
CV (%)	11,1	6,8	7,5	6,8	7,6	6,7

Figura 1. Ensayo de paralelismo del ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica

b) Exactitud

Los resultados obtenidos para este ensayo se muestran en la Tabla 2. Puede observarse que los valores de recuperación alcanzados se encuentran entre el 90–110%, solo un valor (88,6%) quedó fuera

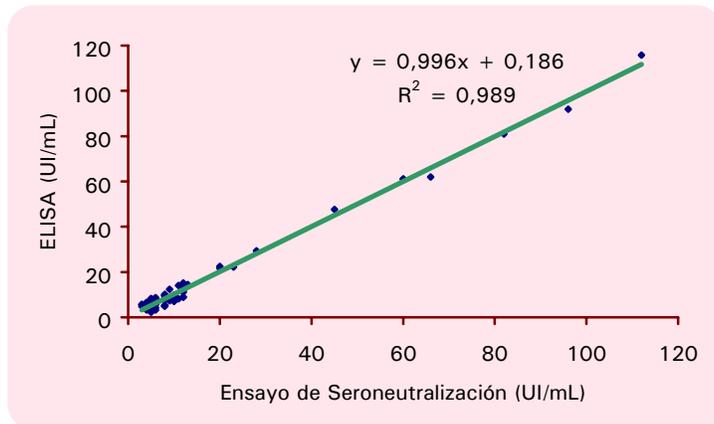
de este rango aunque muy próximo, todo lo cual pone de manifiesto la buena exactitud de nuestro ensayo. El análisis de los datos por la prueba t de Student dio como resultado una probabilidad igual a 0,951, por lo que puede considerarse con un nivel de confianza del 95% que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos y esperados para este ensayo (40). Con este análisis queda demostrado que el ELISA diseñado por nuestro laboratorio para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero de curiel no presenta sesgo y es exacto.

c) Linealidad

La gráfica mostrada en la Fig. 1 permite examinar la linealidad y el paralelismo de la curva de calibración y las muestras a las diferentes diluciones analizadas.

Como puede observarse ambos grupos presentan comportamientos similares, con pendientes muy parecidas. Las muestras presentaron CV por debajo del 10%, excepto M1, la cual alcanzó una variación del 11,1%. Estas pequeñas desviaciones del valor observado no afectaron el paralelismo entre las muestras y la curva

estándar. El elevado coeficiente de determinación de la curva de calibración ($R^2 = 0,984$) constituyó una evidencia más de su comportamiento lineal (27).



R^2 : Coeficiente de determinación

Figura 2. Análisis de regresión lineal entre los valores de actividad de antitoxina tetánica obtenidos por el ELISA y la prueba de neutralización en ratón

Correlación entre el ELISA y el ensayo de neutralización

La práctica usual exige que cuando se desea sustituir un ensayo biológico establecido por una técnica *in vitro*, se debe demostrar antes que los resultados de esta última se corresponden con los de la prueba *in vivo* (27, 35, 36, 37). La Figura 2 muestra el análisis de regresión lineal para 75 sueros de curiel evaluados por el ensayo de neutralización *in vivo* y por el ELISA desarrollado en nuestro Laboratorio.

Como puede apreciarse en el gráfico, nuestro ELISA mostró una excelente correlación con el ensayo de seroneutralización, ya que la pendiente (0,996) es muy cercana a la unidad y la recta corta al Eje "y" en un punto próximo al cero (0,186); siendo la ecuación de ajuste lineal: $ELISA = 0,996 \times \text{Ensayo de neutralización} + 0,186$.

El coeficiente de determinación (R^2) fue de 0,989 e indica que el modelo explica el 98,9% de la variabilidad en el ELISA. El coeficiente de correlación fue de 0,995 indicando a su vez una relación relativamente fuerte entre el ELISA y el Ensayo de neutralización. Por otra parte, el análisis de varianza comprobó que existe una relación estadísticamente significativa ($p = 0,000 < 0,01$) entre los resultados de ambos métodos con un nivel de confianza del 99%. Por último la prueba t de Student para datos pareados confirmó que no existen diferencias significativas entre ambos ensayos con un 95% de confianza ($p = 0,620 > 0,05$) (40).

Como aparece reflejada en la ecuación de regresión, existe una ligera sobreestimación de los niveles de antitoxina tetánica por parte del ELISA con respecto al ensayo biológico. Este fenómeno se manifiesta por lo general para muestras con bajos niveles de antitoxina y parece estar relacionado con la presencia de anticuerpos inespecíficos o de baja afinidad que son capaces de reconocer la toxina pero no de neutralizar su acción *in vivo* y ha sido una de las razones fundamentales para el desarrollo del ELISA de inhibición de antígeno (ToBI), el cual favorece la unión entre la antitoxina y su antígeno evitando la aparición de estos fenómenos (14, 15, 16, 17, 33, 41, 42). No obstante el ToBI es un ensayo mucho más complicado sobre todo cuando se requiere procesar muchas muestras (7, 17).

Nuestros resultados están en correspondencia con los alcanzados por otros autores que han desarrollado y correlacionado ELISA similares para determinar anticuerpos antitetánicos en sueros humanos, de curiel o ratón (14, 15, 16, 34, 42, 43), y demuestran que el ELISA indirecto desarrollado en nuestro laboratorio para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero de curiel reproduce satisfactoriamente los resultados obtenidos por el tradicional ensayo biológico para las 75 muestras estudiadas, por lo que podría utilizarse como método alternativo en la determinación de la potencia de toxoides tetánicos.

Aplicación técnica

Una de las principales desventajas de las pruebas en animales está dada por la gran

cantidad de individuos que estas involucran y las implicaciones económicas que esto conlleva. Este elevado requerimiento hace imposible el análisis de las muestras de forma independiente por lo que la capacidad neutralizante del antisuero, es evaluada en mezclas homogéneas de los curieles inoculados con cada lote de toxoide en estudio (9, 29). Este inconveniente de las pruebas biológicas constituye otra de las ventajas de los ensayos alternativos, que por sus bajos costos propician el análisis individual de las muestras, evitándose así la aparición de posibles fenómenos de enmascaramiento de la respuesta específica de cada animal (43).

Con el objetivo de demostrar la aplicación de nuestro ELISA, fueron analizados por este método la mezcla y los sueros individuales de seis curieles inoculados con 15 lotes de toxoide tetánico. Para cada grupo se determinó la media geométrica, el intervalo de confianza al 95%, y el porcentaje de seroprotección tomando como valor de corte 2,2 UI/mL, mostrados en la Tabla 3.

Comparando los resultados individuales con respecto a la mezcla de los sueros para cada lote de toxoide se observa que en ningún caso la mezcla de un grupo representa apropiadamente la respuesta de cada animal por separado. Como

puede apreciarse, individuos diferentes inoculados con el mismo lote de toxoide responden de manera también diferente al estímulo efectuado. El análisis de los niveles de antitoxina tetánica por separado aporta más información acerca de la respuesta real de cada individuo, por lo que recrea con una mayor veracidad la respuesta que podría esperarse en humanos a partir de la inmunización con este producto.

Solo un animal (A6, Lote 2) no alcanzó el límite de seroprotección establecido por lo que este grupo obtuvo un nivel de seroprotección del 83%, en el resto este indicador se mantuvo en el 100%, lo cual está en concordancia con la calidad de la vacuna antitetánica producida en el Instituto Finlay utilizada para la realización de este estudio.

Todos estos resultados, así como la menor variabilidad, costo y duración de los ensayos *in vitro*, demuestran que el ELISA desarrollado por nuestro laboratorio como método alternativo al ensayo de seroneutralización *in vivo* para la determinación de la potencia del toxoide tetánico constituye una herramienta valiosa, de gran utilidad y seguridad en el control de la calidad de vacunas antitetánicas.

Tabla 3. Evaluación por ELISA del comportamiento de la respuesta individual en curieles contra 15 lotes de toxoide tetánico

Lotes	Muestras (UI/mL)							VMG (UI/mL)	IC 95% (UI/mL)	SP (%)
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	Mezcla			
1	12,7	24,6	28,2	26,3	4,5	15,9	20,8	16,0	9,2 – 27,8	100
2	13,0	14,4	14,4	4,4	13,2	1,9	12,5	8,2	4,1 – 16,1	83
3	12,5	20,2	14,4	11,9	14,4	16,5	16,5	14,8	12,6 – 17,2	100
4	11,5	13,8	11,2	10,8	16,5	5,5	15,3	11,0	8,1 – 14,8	100
5	27,5	10,0	33,0	15,0	16,1	35,2	21,0	20,6	13,8 – 30,9	100
6	22,7	32,4	24,2	27,2	21,6	26,0	21,1	25,4	22,7 – 28,6	100
7	25,6	23,7	33,4	4,8	15,0	14,9	22,3	16,7	9,6 – 29,0	100
8	12,6	16,0	11,3	9,7	25,3	13,5	17,3	14,0	10,7 – 18,3	100
9	37,3	19,3	15,4	19,4	19,8	18,1	26,3	20,6	16,2 – 26,3	100
10	26,3	27,3	18,9	9,2	20,5	46,1	22,6	22,2	14,5 – 33,9	100
11	23,7	9,4	24,3	4,1	17,1	10,0	13,0	12,5	7,2 – 21,5	100
12	8,7	9,1	4,2	25,1	6,8	3,6	7,7	7,7	4,4 – 13,4	100
13	18,3	10,4	10,8	20,6	10,4	21,6	16,8	14,6	10,9 – 19,4	100
14	14,0	12,5	9,9	3,2	7,5	20,5	10,0	9,7	5,8 – 16,3	100
15	4,4	49,0	10,3	8,1	9,0	14,0	13,9	11,5	6,0 – 21,9	100

A1-A6: Curieles individuales

IC 95%: Intervalo de confianza al 95%

VMG: Valores medios geométricos

SP: Seroprotección

Referencias

1. Halder M. Three Rs Potential in the development and quality control of immunobiologicals. *AITEEK*. 2001; 18 suppl 1:13-46.
2. Hartung T. Three Rs Potential in the development and quality control of pharmaceuticals. *AITEEK*. 2001; 18 suppl 1:1-12.
3. Winsnes R, et al. Serological assays as alternatives to the challenge test for batch release of tetanus vaccines for human use. *Dev Biol Stand*. 1999; 101:277-288.
4. Hong HA, et al. The use of alternatives to animal test in developing countries. *Dev Biol Stand*. 1999; 101:209-214.
5. Hill EH. *In vitro* alternatives to animal testing: breakthroughs and challenges. *Animal Guardian*. 1999; 14-16.
6. Milstien J. WHO activities towards the three Rs in the development and control of biological products. *Dev Biol Stand*. 1996; 86:31-39.
7. Halder M., et al. ECVAM's contribution to the implementation of the Three Rs in the production and quality control of biologicals. *ATLA*. 2002; 30:93-108.
8. Zaffran M. Immunize every child: GAVI strategy for sustainable immunization services. GAVI Second Board Meeting. 2000; 9-44.
9. Peel MM. Measurement of tetanus antitoxin: II, toxin neutralization. *J Biol Stand*. 1980; 8: 191-207.
10. Peel MM. Measurement of tetanus antitoxin: I, indirect haemagglutination. *J Biol Stand*. 1980; 8:177-189.
11. Gupta RK, Maheshwari SC, Singh H. The titration of tetanus antitoxin: II, a comparative evaluation of the indirect haemagglutination and toxin neutralization tests. *J Biol Stand*. 1984; 12:137-143.
12. Maheshwari SC. Quantitation of tetanus and diphtheria antitoxins in mouse sera by indirect haemagglutination. *J Commun Dis*. 1998; 30(1):23-28.
13. Gentili G, Pini C, Collotti C. The use of an immunoenzymatic assay for the estimation of tetanus antitoxin in human sera: a comparison with seroneutralization and indirect haemagglutination. *J Biol Stand*. 1985; 13:53-59.
14. Hendriksen CFM, et al. Interlaboratory validation of *in vitro* serological assay systems to assess the Potency of Tetanus Toxoid in Vaccines for Veterinary Use. *Biologicals*. 1994; 22:257-268.
15. Gupta RK, Siber GR. Use of *in Vitro* Cell Assay and ELISA in the United States Potency Test of vaccines containing Adsorbed Diphtheria and Tetanus Toxoids. *Dev Biol Stand*. 1996; 86:207-215.
16. Ochoa R, et al. Validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano. *Vaccimonitor*. 2000; 9(4):16-21.
17. Van der Gun J, et al. Validation of the toxin-binding inhibition (ToBI) test for estimation of the potency of the tetanus toxoid component in vaccines. *Dev Biol Stand*. 1996; 86:199-206.
18. Habermann E, Wiegand H. A rapid and simple radio immunological procedure for measuring low concentrations of tetanus antibodies. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 1973; 276:321-326.
19. Aggerbeck H, Norgaard-Pedersen B, Heron I. Simultaneous quantitation of diphtheria and tetanus antibodies by double antigen, time-resolved fluorescence immunoassay. *J Immunological Methods*. 1996; 190:171-183.
20. Maple PAC, Jones CS, Andrews NJ. Time resolved fluorometric immunoassay, using europium labelled antihuman IgG, for the detection of human tetanus antitoxin in serum. *J Clin Pathol*. 2001; 54(10):812-815.
21. Layton GT. A micro enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and radioimmunosorbent technique (RIST) for the detection of immunity to clinical tetanus. *Med Lab Sci*. 1980; 37:323-329.
22. CPMP/SWP/728/95. Replacement of animal studies by *in vitro* models. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; 1997.
23. Charton E. Reduction and replacement of animal test in the European Pharmacopoeia: recent developments for monographs on biological substances. *Pharmeuropa*. 1999; 11:197-199.
24. Plikaytis BD, et al. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 1991; 29:1439-1446.
25. Plikaytis BD, et al. Program ELISA user's manual. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention; 1993.
26. Broughton PMG, et al. Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use. Part 1: Quantitative test. European Committee for Clinical Laboratory Standards; 1986.
27. Ochoa R. y otros. Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *Vaccimonitor*. 1999; 8(10):9-13.
28. WHO. Biologicals Substances. International Standards & Reference Reagents; 1991.
29. FDA. Minimum requirements: Tetanus toxoid. Public Health Service; 1953.

30. Wang AS. Detection of antibodies to tetanus toxoid: comparison of the direct haemagglutination method with a radioimmunoassay. *J Clin Pathol.* 1982; 35: 1138-1141.
31. Melville-Smith ME, *et al.* A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the toxin neutralization test in mice as a method for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *J Biol Stand.* 1983; 11:137-144.
32. Simonsen O, Bentzon MW, Heron I. ELISA for the routine determination of antitoxic immunity to tetanus. *J Biol Stand.* 1986; 14: 231-239.
33. Galazka AM. The Immunological Basis for Immunization Series. Tetanus. WHO/EPI/GEN; 1996.
34. Gupta RK. ELISA for titration of antibodies to tetanus toxoid in sera of immunized guinea pigs as an alternative to the toxin neutralization test in mice. *J Immunol Methods.* 1995; 179(2): 277-279.
35. ICH. Text on validation of analytical procedures. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 1994.
36. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation of analytical assays. WHO; 1997.
37. Huggins J. Alternatives to animal testing: Research, Trends, Validation and Regulatory Acceptance. *ALTEEK.* 2001; 18 Suppl 2: 47.
38. Kuhlmann WD, Rieger J. Diphtheria immunity of a west german population by measurement of antitoxin antibodies with enzyme linked immunosorbent assay. *Immunol Infect Dis.* 1995; 5: 10-14.
39. Rodríguez O *et al.* Ensayo de potencia *in vitro* para la vacuna cubana recombinante contra la hepatitis B. *Biotecnología Aplicada.* 2001; 18: 154-158.
40. Sigarroa A. Biometría y Diseño Experimental. Cuba: Editorial Pueblo y Educación; 1985.
41. Dokmetjian J. *et al.* A possible explanation for the discrepancy between ELISA and neutralising antibodies to tetanus toxin. *Vaccine.* 2000; 18(24): 2698-2703.
42. Pharmeuropa Bio 2001-2. Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of tetanus toxoid vaccines for human use. European Pharmacopoeia Forum; 2002.
43. Fajardo EM., *et al.* UltramicroELISA for measuring tetanus antitoxin in human sera. Bulletin of PAHO. 1996; 30(1), 9-17.

Introduction of an ELISA as an alternative assay for potency testing of tetanus toxoid vaccines

Abstract

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to quantify tetanus antitoxin activity in guinea pig sera based on a previously calibrated standard. This test is proposed as an alternative to the traditional *in vivo* neutralization assay used for potency evaluation of tetanus vaccines. The accuracy, precision and linearity of our ELISA were determined. Both methods were used to evaluate 75 guinea pig sera and the results were compared by linear regression analysis. The individual immunological responses against different lots of tetanus vaccine were also studied. The ELISA showed an excellent accuracy, with recovery values between 90-110%; intra, inter and total-assay imprecision ranging around 10% and parallelism deviations below 10%. A high correlation was found between our ELISA and the *in vivo* neutralization assay ($R^2 = 0,989$). The seroprotection levels of the tetanus vaccines tested were over 83%. All those results indicate our ELISA is an excellent alternative procedure for potency testing of tetanus toxoid vaccines.

Keywords: ELISA, alternative methods, *in vitro* tests, tetanus toxoid