

OPTIMIZACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA RELATIVA ANTÍGENOS VACUNALES DE *LEPTOSPIRA* MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA SÁNDWICH.

M. L. Matos ⁽¹⁾, P. M. Samter ⁽¹⁾, S. Reidel ⁽¹⁾, N. I. Losino ⁽¹⁾, F.F. Nigro ⁽¹⁾

lmatos@inti.gov.ar

⁽¹⁾ Dto. Desarrollos Bioanalíticos-DT Biotecnología-SOAC-GODTel - INTI.

Palabras Clave: Elisa, Leptospirosis, Vacuna, Hamsters.

INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una zoonosis producida por una bacteria llamada *Leptospira*. Es de amplia distribución geográfica y aparece en forma aislada o en brotes epidémicos estacionales. Afecta numerosos animales, especialmente mamíferos causando grandes pérdidas económicas en animales de cría.

Las vacunas son el primer frente de acción para la prevención de esta enfermedad. Actualmente, el modelo "hámsters" se utiliza en las pruebas *in vivo* de potencia de bacterina vacunal de *Leptospira* clasificado como Requisito Estándar en el título 9 del Código de Regulaciones Federales debido a su alta susceptibilidad a la infección. El Centro para Biológicos Veterinarios de Estados Unidos (CVB) considera que esta prueba puede reemplazarse por un ensayo *in vitro* que debe desempeñarse de manera equivalente al Requisito Estándar. Debido al compromiso de reemplazar las pruebas en animales por ensayos *in vitro*, el CVB ha desarrollado un ELISA y los reactivos asociados para evaluar la potencia de vacunas potenciales. Los detalles de este ensayo se encuentran en los Métodos de Ensayos Suplementarios (SAM) 624-627[1]. Esta optimización se realizó en acuerdo con SENASA para la validación de la técnica de ELISA en vista a un futuro remplazo del ensayo *in vivo* en el organismo de control.

OBJETIVOS

Puesta a punto de la determinación de la potencia relativa de antígenos vacunales de *Leptospira* mediante la técnica de ELISA sándwich y determinación de la potencia en muestras de vacunas modelo.

MATERIALES Y METODOS

Para esta puesta a punto, se siguieron los lineamientos del SAM 624 de la APHIS, USDA[2].

Bacterina de referencia (BR):

El vial de BR se resuspendió en 500 µL de agua. A 135 µl de esta suspensión se adicionó

135 µl de Sc de NaCl 0,85%. Esta solución es la muestra inicial para la curva de BR y es equivalente a una bacterina de potencia 1 para una vacuna de 5 mL de dosis de aplicación.

Muestras:

Las muestras procesadas correspondieron a tres (3) vacunas formuladas (VF), las cuales fueron denominadas A, B y C y se prepararon utilizando para la extracción iguales cantidades de muestra y buffer fosfato de elusión e incubando por 16-18 hs a 37°C. Luego, se centrifugó la totalidad de la muestra a 10.000 g por 5 a 15 °C. Se recuperó el sobrenadante y se conservó en baño de hielo hasta su uso.

Método ELISA:

De acuerdo al procedimiento, se recubrió una placa con el anticuerpo policlonal (LP PAB) diluido 1:4800 en buffer carbonato-bicarbonato. Se incubó a 2-7°C por 16-20 h. Luego, se prepararon y sembraron las diluciones seriadas al medio de BR de referencia hasta 4096 y para las VF hasta 512. Se incubó la placa por 60' a 37°C. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 0,05% y se agregó una dilución 1:20.000 de anticuerpo monoclonal anti *L. pomona*. Se incubó 60' a 37°C. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 0,05% y se agregó una dilución 1:1000 de anticuerpo anti ratón conjugado con peroxidasa. Se incubó 60' a 37°C y se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 0,05%. Se adicionó la solución reveladora de ABTS/H₂O₂. Se incubó a 37°C por 45'. Se realizaron lecturas de absorbancia a 415 nm cada 5' hasta obtener un valor de absorbancia mayor a 1.000 para la dilución inicial de la BR y estabilización de las lecturas. Para la evaluación de desempeño del ELISA se realizaron 8 ensayos independientes cuyos resultados se indican a continuación.

RESULTADOS

Los resultados se analizaron según el procedimiento CVBSOP0102.03[2], utilizando el método de “ensayo de líneas paralelas” con cálculos manuales mediante la comparación de las pendientes obtenidas a partir de las curvas de absorbancia para las muestras, en el rango de datos para la regresión lineal de la BR. Ejemplo de Curva obtenida para la BR:

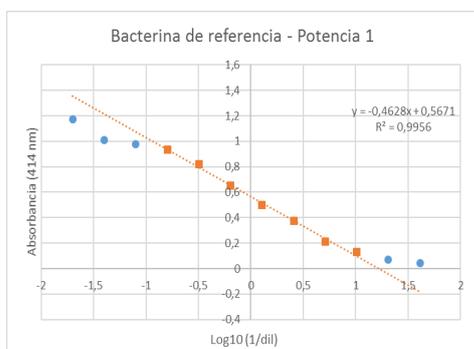


Figura 1: Respuesta a 414 nm para el ensayo de la BR. (●) Curva BR. (■) Sección lineal de la curva.

Ejemplo de Curvas obtenidas para VF analizadas frente a la BR en su rango lineal:

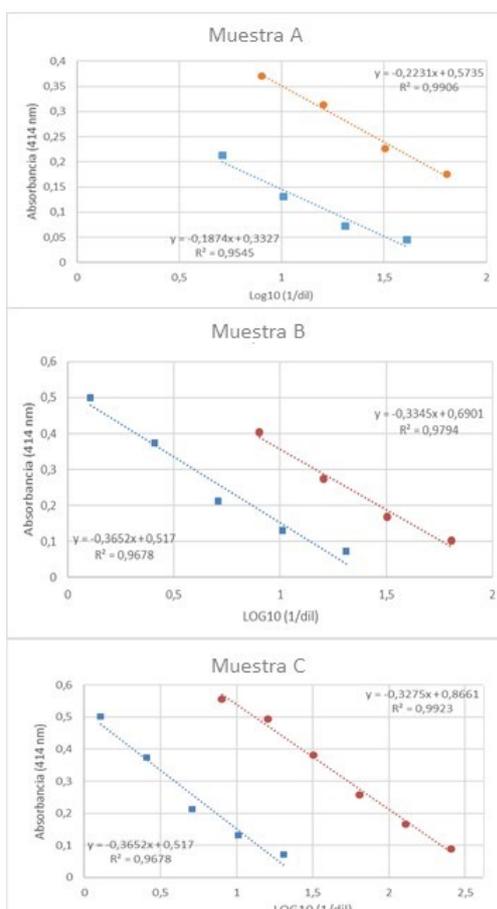
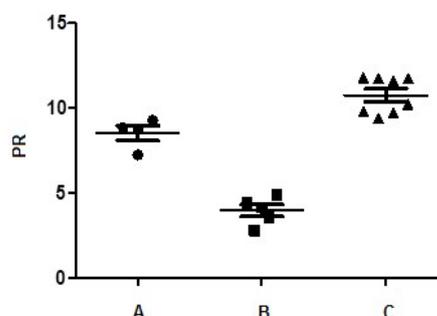


Figura 2: Respuesta a 414 nm para el ensayo con las vacunas A, B y C. (●) corresponden al rango considerado lineal para la muestra. (■) rango de comparación correspondiente a la BR.

Análisis de Potencia relativa (PR)

Se analizó la PR de las distintas muestras en 4, 6 y 8 ensayos independientes (Fig 3). Las vacunas A, B y C cumplieron con el parámetro $PR > 1$. A continuación se muestra un breve análisis de la dispersión de valores de PR para cada muestra analizada.



	A (N=4)	B (N=6)	C (N=8)
Media PR	8,538	3,966	10,76
DE	0,8890	0,8086	1,058
EE	0,4445	0,3616	0,3742

Figura 3: Dispersión para los valores de PR obtenidos en los distintos ensayos para las muestras de vacuna. DE: Desvío estandar. EE: Error estandar.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se logró obtener una curva sigmoidea de diluciones de BR de acuerdo con lo indicado en el SAM 624[2]. Las curvas obtenidas en los 8 ensayos independientes muestran consistencia en los valores obtenidos para los parámetros de pendiente y ordenada al origen para la BR (datos no mostrados) y para las PR calculadas para las tres muestras de VF evaluadas.

Se demostró el potencial de la técnica para la determinación de PR en VF. Adicionalmente, la capacidad de cuantificación de esta técnica sumado a su aplicación práctica permitiría sumarla a los ensayos de control de calidad durante el proceso de producción de vacunas.

En la siguiente etapa, se planea validar los valores de PR frente a vacunas ensayadas por el método de referencia en hámster en colaboración con SENASA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] “Supplemental Assay Method for In vitro Potency Testing of Leptospira interrogans serogroup pomona Bacterins”, https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biology/publications/624.pdf

[2] “United States Department of Agriculture Center for Veterinary Biologics Standard Operating Policy/Procedure”, https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biology/publications/CVBSOP0102.pdf