

# DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTÍGENOS EN VACUNAS ANTIRRÁBICAS DE USO VETERINARIO POR UNA PRUEBA INMUNOENZIMÁTICA

G Miceli<sup>1</sup>, E Nosetto<sup>1</sup>, J Esteves Madero<sup>2</sup>, AM Díaz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

<sup>2</sup>Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA)

<sup>3</sup>Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ).

**RESUMEN:** Se desarrolló, estandarizó y evaluó un método indirecto de enzimoimmunoensayo (ELISA), reproducible y rápido, para determinar la concentración de antígenos de vacunas antirrábicas producidas en cultivos celulares (BHK). Se consideró la sensibilidad y la reproducibilidad de los resultados del ELISA in vitro propuesto, en relación con la prueba estándar de potencia NIH in vivo. De los 20 lotes de vacunas estudiados, 14 cumplieron con el Requisito Mínimo de Potencia recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para la prueba NIH in vivo, muestras de los mismos lotes cumplieron con los parámetros del Análisis de Varianza (ANOVA) de la prueba in vitro. La técnica de ELISA propuesta se considera útil como método alternativo rápido para el control de proceso de producción de vacunas antirrábicas de uso veterinario.

**Palabras claves:** ELISA, rabia, NIH.

## ENZYME LINKED IMMUNOASSAY FOR DETERMINATION OF ANTIGENS OF VETERINARY RABIES VACCINE

**ABSTRACT:** An indirect enzyme linked immunoassay (ELISA) was developed and evaluated as a rapid and reproducible test to determine the concentration of antigens of rabies vaccine produce in BHK cells. The sensitivity and reproducibility of the results of proposed in vitro ELISA method were compare to the standard in vivo NIH potency test. Of the 20 studied lots of vaccines, 14 fulfilled the Minimum Requirement of Potency recommended by the World Health Organization (WHO), for the NIH test. Samples of the same lots also met the parameters of the ANOVA analysis. The proposed ELISA test showed to be a useful alternative rapid method to apply during "in process" controls of veterinary rabies vaccine.

**Key Words:** ELISA, rabies, NIH test.

Fecha de recepción: 18/07/02

Fecha de aprobación: 12/06/03

---

**Dirección para correspondencia:** Graciela Miceli. CC 296 (B1900AVW) La Plata. Argentina. Tel/Fax: 54-221-4257980.

**E-mail:** gmiceli@fcv.unlp.edu.ar

---

## INTRODUCCIÓN

La rabia constituye un importante problema para la salud, tanto de seres humanos como de animales (1, 2). Programas antirrábicos sostenidos en el tiempo, permiten el control y la erradicación de la enfermedad, para lo cual es indispensable que se utilicen oportunamente sus tres componentes básicos: educación para la salud, vigilancia epidemiológica y campañas de inmunización periódicas con vacunas de calidad comprobada.

A partir de 1981 se han desarrollado varias técnicas *in vitro* (3, 4, 5, 6) para el control de vacunas antirrábicas durante el proceso de producción, a fin de optimizar los métodos de elaboración y predecir la calidad del producto final.

La prueba de potencia NIH *in vivo* (7, 8, 9) se emplea a nivel internacional para la evaluación de la potencia de las vacunas antirrábicas. Es un método de extinción de antígenos, que presenta la desventaja de altos índices de variabilidad y de costos operativos. En nuestro laboratorio se desarrolló una prueba de ELISA (10, 11, 12, 13) económica y sencilla, que se propone como método alternativo para valorar la concentración de antígenos vacunales, durante la etapa de producción de vacunas antirrábicas preparadas en cultivos celulares, para uso veterinario.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Desarrollo de la prueba de ELISA:**

a) Se utilizaron microplacas de varias marcas comerciales y muestras de 20 lotes distintos de vacunas preparadas en células BHK e inactivadas con Beta-propiolactona. Como referencia se empleó la vacuna BHK-PV-1 producida en el INPPAZ (OPS/OMS), cuya potencia es de 1 UI/ml, determinada por la prueba NIH, reconstituida de acuerdo a la indicación del laboratorio productor.

b) Se determinó la eficiencia de dos detergentes para liberar la glicoproteína viral a ser utilizada como antígeno. Para ello se usaron tres alícuotas de vacuna de referencia: la primera se trató con Emulphogene BC 720 en proporción 1:10 y se dejó a temperatura ambiente 30 m, la segunda se reconstituyó con Nonidet P 40 al 1%, durante 60 m a 4 ° C y la última, sin tratar, como control. Todas las muestras se centrifugaron 30 m a 43000 g, con la finalidad de retener solamente la glicoproteína viral.

c) Se produjo suero antirrábico policlonal anti-PV (Cepa Pasteur), inoculando conejos con 6

dosis de vacuna antirrábica de referencia BHK-PV-1, seguidas de 3 dosis de refuerzo con virus PV propagado en células BHK, purificado por el método de Schneider (14) e inactivado con Beta-propiolactona.

El suero antirrábico policlonal se adsorbió con medio de cultivo en proporción 1:1, el mismo que se utilizó en la elaboración de las vacunas, se mantuvo en refrigerador a 4° C bajo agitación continua durante la noche, para inhibir la actividad de anticuerpos inespecíficos contra componentes del medio en que se propagó el virus.

d) Se utilizó como conjugado un suero anti-gamaglobulina de conejo producido en cabra y conjugado con peroxidasa (anti IgG) (Cappel, Organon Teknika Corp. USA). Se determinaron las diluciones de trabajo del suero y del conjugado por ensayos de titulación en damero, se utilizó como antígeno la vacuna de referencia BHK-PV-1 y como sustrato ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

e) Se determinó la concentración de proteínas totales, por el método de Lowry (15) y se identificaron mediante la técnica de SDS-Page (16).

### **Titulación de vacunas por ELISA**

Se prepararon muestras de vacuna de referencia y vacunas a evaluar, todas contenían concentraciones de 50 µg/ml de proteínas totales (dilución inicial) y se sensibilizaron microplacas con 100 µl de diluciones seriadas, en base 2, de ambos tipos de vacunas, en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Se incubaron una noche a 4° C Se bloquearon las placas con PBS-Tween-albúmina bovina al 0,1%, 60 m a 37° C. Se distribuyó la dilución de trabajo de suero antirrábico policlonal, se lo dejó reaccionar una noche a temperatura ambiente. Se distribuyó el conjugado anti IgG y se incubó 60 m a 37° C. Por último se reveló la reacción con el sustrato ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en buffer citrato-fosfato 0,05 M, pH 5 y se mantuvieron en ambiente oscuro durante 15 m a temperatura ambiente. La lectura de las absorbancias se realizó a 405 nm. Como solución de lavado se utilizó PBS-tween20, 8 veces entre las sucesivas etapas de la técnica. Todas las diluciones se efectuaron por duplicado e incluyeron controles con medio de cultivo y blancos de reactivo. Se determinaron los títulos de la vacuna de referencia y de cada vacuna problema, por ensayo de líneas paralelas y los resultados se validaron por Análisis de Varianza: linealidad, paralelismo, regresión y diferencias entre las vacunas (17). Las diluciones de vacunas problemas y vacuna de referencia se expresaron como logaritmos de las densidades ópti-

cas (DO). Se calculó la potencia con un intervalo de confianza del 95%.

### Prueba de potencia NIH

Las pruebas de potencia *in vivo* se realizaron de acuerdo con la técnica de NIH recomendada por la OMS (7) y la actividad de las vacunas se expresó como Potencia Relativa. Se utilizó vacuna de Referencia BHK-PV-1, distribuida por el INPPAZ OPS/OMS.

## RESULTADOS

a) En este trabajo la adhesión de antígeno fue óptima en las placas Dynatech Immulon II.

b) Se observó interferencia en la unión de antígeno a la fase sólida, cuando se titularon vacunas tratadas con detergentes. Por lo tanto, la evaluación de la técnica se hizo con vacunas de referencia y problemas completas.

c) El análisis de las curvas de titulación en damero indicó que las reacciones óptimas, con vacuna de referencia, se obtuvieron con las diluciones 1:400 para el suero antirrábico policlonal y 1:3200 para el conjugado.

La sensibilidad se evaluó con la vacuna de referencia, se observó que todos los valores de las lecturas (DO) oscilaron dentro de los 2 desvíos estándar.

La reproducibilidad, se evaluó con la vacuna de referencia, los resultados de las titulaciones

por la técnica de ELISA fueron evaluados por el Ensayo de Fisher (18). No se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas.

d) Para demostrar el efecto Dosis-Respuesta, se realizaron 9 pruebas de ELISA, independientes entre sí. Se utilizaron los valores promedio de las diluciones de las 9 pruebas y se calcularon 2 desvíos estándar de cada una.

e) La prueba estándar de potencia NIH "in vivo" demostró que, de las muestras de los 20 lotes de vacunas estudiadas, 14 cumplieron con el Requisito Mínimo de Potencia recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para vacunas antirrábicas de uso veterinario: 1.0 UI/ml; 8 de ellas cumplieron con todos los parámetros de ANOVA, correspondientes al ensayo de líneas paralelas aplicado a las pruebas de ELISA; las 6 restantes cumplieron parcialmente, se observaron discrepancias en "diferencias entre vacunas", por lo cual el ANOVA del ELISA es válido. Los 6 lotes restantes no cumplieron con los requisitos de la prueba NIH ni con los parámetros de ANOVA del ELISA (Tabla 1).

f) Los resultados de las pruebas de SDS-Page demostraron que tanto las muestras de las vacunas problemas como de la referencia; todas presentaron bandas de mayor concentración de proteínas a nivel del estándar de peso molecular 66 kD, marcador para la glicoproteína del virus rábico.

Tabla 1: Resultados de las pruebas de potencia nih "in vivo" y análisis de anova de las pruebas de Elisa "in vitro".

Table 1 Results of the *in vivo* nih potency test with variance analysis of the *in vitro* elisa assay.

PRUEBA POTENCIA NIH				PRUEBA ELISA/ANOVA				
Vacunas Problemas	Nº de vacunas	DE <sup>1</sup> 50%	UI/ml	Nº de Vacunas	P	L	R	EV
Aprobadas	14	1:89	1,0	8	+	+	+	+
				6	+	+	+	-
No Aprobadas	6	1:65	< 1,0	2	-	-	-	-
				4	-	+	-	-
Vacuna Referencia	1	1:79 <sup>2</sup>	1,0					

1-Valores expresados en Promedios

2-DE50% = 1:79+/- 2 DE (1:67-1:91)

P: paralelismo L: linealidad R: regresión EV: diferencias entre vacunas.

## DISCUSIÓN

El desarrollo y uso de pruebas *in vitro* para control de procesos de producción de vacunas antirrábicas comenzó en el año 1982 (19). En 1985 (20), 1988 (21) y 1996 (22) se describieron pruebas de ELISA que utilizaban anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos de virus rábico. En este trabajo se evaluó el comportamiento de un suero policlonal antiviral PV purificado (homólogo del virus vacunal presente en todas las vacunas controladas) demostró detectar concentraciones promedio de 50 µg/ml de proteínas antigénicas de vacuna. La producción del suero policlonal es simple y permite obtener altos niveles de anticuerpos (títulos de 1:1500 por Contrainmuno-electroforesis y 1:5000 por seroneutralización) antiviral PV. El uso de vacuna de referencia elaborada también, con virus homólogo PV influiría favorablemente sobre la sensibilidad de la técnica propuesta tal como sucede con otras técnicas de control *in vitro* (5,6).

## CONCLUSIÓN

La prueba *in vitro* de ELISA propuesta en este estudio, es útil para evaluar el contenido antigénico de las vacunas antirrábicas. Tiene capacidad para discriminar entre vacunas aceptadas o rechazadas por la prueba estándar de potencia NIH *in vivo*.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1-Dellepiane N, Díaz AM. La rabia. I Principales características del agente etiológico y de la enfermedad. Rev Arg Microbiol. 1986; 18 (2):83-95.
- 2-Dellepiane N, Díaz AM. La rabia. II Situación Epidemiológica en las Américas. Vacunas e Inmunidad. Rev Arg Microbiol. 1987; 19 (3):125-138.
- 3-Díaz AM, Robin O, Gorostiaga M, Miceli G. Manual de Producción y Control de la Vacuna Antirrábica producida en monocapa de células BHK. Versión Preliminar, 57 páginas. INPPAZ/OPS/OMS. 1995; Martínez, Buenos Aires.
- 4- Ferguson M, Seagrott V, Schild GC. A collaborative study on the use of single radial immunodiffusion for the assay of rabies virus glycoprotein. J Biol Stand. 1984; 12:283-294.
- 5- Miceli G, Díaz AM, Torroba J. Evaluación de la Técnica de Contrainmuno-electroforesis para determinar la potencia de las vacunas Antirrábicas. Rev Inst Med trop. S Paulo. 1993; 35 (6):543-550.
- 6- Miceli G, Torroba J, Torres W, Esteves Madero J, Díaz AM. Evaluation of Standard Reagents for Radial-Immunodiffusion assays *in vitro* Control of Rabies vaccine. Rev Inst Med trop S Paulo 2000; 42 (3):153-156.
- 7-Wilbur LA, Aubert MFA. The NIH test for potency.

- Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies 4<sup>th</sup> ed. Geneva WHO 1996:360-368.
- 8-Wiktor TJ. Tissue culture methods. In: Kaplan MM, Koprowski H. eds. Laboratory techniques in rabies. 3<sup>rd</sup> ed. Geneva WHO 1973:101-123.
- 9-Seligman EB. The NIH test for potency. In: Kaplan MM, Koprowski H eds. Laboratory techniques in rabies, 3<sup>rd</sup>. Geneva, WHO 1973:279-286.
- 10-Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. J Immunol Methods. 1992; 150:5-21.
- 11-Rooijackers EJ, Uittenbogaard JP, Groen Josterhaus AD. Rabies vaccine potency control: comparison of ELISA system for antigenicity testing. J Virol Methods 1996; 58 (1-2):111-9.
- 12-Thraenhart O, Ramakrishnan K. Standardization of an enzyme immunoassay for the *in vitro* potency assay of inactivated tissue culture rabies vaccines: determination of the rabies virus glycoprotein with polyclonal antiserum. J Biol Stand. 1989; 17:291-309.
- 13-Thraenhart O. The Essen-Elisa for the determination of the glycoprotein content of inactivated cell-culture rabies vaccines. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies 4<sup>th</sup> ed, Geneva WHO 1996 :389-393.
- 14-Schneider L. Aluminium phosphate method for rabies purification. Kaplan MM, Koprowski H. eds. Laboratory techniques in rabies 3<sup>rd</sup> ed Geneva, WHO 1973:179-181.
- 15-Lowry D. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chemistry 1951;195:265-275.
- 16-Margni R. Fundamentos de Inmunología e Inmunológica. 5ta ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires 1996: 906-922.
- 17-Finney DJ. Statistical methods in biological assay. 3<sup>rd</sup> ed. London. Griffin & Co Ltd. 1978 :99-138.
- 18-Spiegel MR. Estadística. 2<sup>da</sup> ed. McGraw-Hill. Intamericana de España 1991:375-410.
- 19-Barth R, Gross-Albenhausen E, Jaeger O, Milcke L. The antibody-binding test a useful method for quantitative determination of inactivated rabies virus antigen. J Biol Stand 1982; 9:81-89.
- 20-Lafon M, Perrin P, Versmisse P, Sureau P. Use of monoclonal antibody for quantization of rabies vaccine glycoprotein by enzyme immunoassay. J Biol Stand 1985; 13:295-301.
- 21-Lafon M, Perrin P, Sureau P. Enzyme-immunoassay (EIA) for Potency Control of Rabies Vaccines. Progress in Rabies Control. Edited by Thraenhart O, Koprowski H, Bogel K, Sureau P. IMVI ESSEN/WHO 1988 :315-319.
- 22-Perrin P, Lafon M, Sureau P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of the glycoprotein content of rabies vaccines. Meslin F, Kaplan M, Koprowski H. Laboratory Techniques in Rabies, 4<sup>th</sup> ed. Geneva, WHO, 1996:383-388.