

Determinación rápida de la identidad del polisacárido de *Salmonella* Typhi y toxoide diftérico en vacunas conjugadas

Dianelys Ochoa-Sicilia,* Jessy Pedroso-Fernández, Elizabeth González-Aznar, Dagmar García-Rivera, Osmir Cabrera-Blanco

Instituto Finlay de Vacunas. Ave 27, No. 19805, La Lisa. La Habana, Cuba.

email: dochoa@finlay.edu.cu

El polisacárido Vi (PsVi) de *Salmonella* Typhi es un antígeno T-independiente y ha demostrado ser protector en adultos jóvenes. Sin embargo, para aumentar la respuesta de anticuerpos y conferir propiedades T-dependientes al polisacárido, se ha conjugado a proteínas. Dentro de los controles exigidos por los organismos regulatorios para estas vacunas está la identidad antigénica de sus componentes y para eso se recomiendan el uso de técnicas de Resonancia Magnética Nuclear o técnicas serológicas. El objetivo del presente trabajo, fue establecer las condiciones óptimas de trabajo de un Dot Blot que permitiera determinar, rápidamente, la identidad de los antígenos en vacunas conjugadas contra *S. Typhi*. Para ello, se estudiaron los tiempos de incubación, las concentraciones óptimas de anticuerpo monoclonal (AcM) y del ingrediente farmacéutico activo (IFA), así como los volúmenes de aplicación óptimos para las IFAs y formulaciones vacunales, tanto para el PsVi como para el toxoide diftérico (TD). Los resultados mostraron que para la determinación de la identidad antigénica fueron suficientes 5 µL de muestras de los conjugados monovalentes en una dilución de 1/10 (vol/vol) e igual volumen para las formulaciones vacunales. Quedó demostrado que la concentración de 2,5 µg/mL para el AcM contra el PsVi y a 2 µg/mL para el AcM contra TD fueron suficientes para la determinación; mientras que los tiempos de incubación fueron ajustados a 15 min con incubación a 37 °C. Como conclusión del trabajo se puede decir que quedaron establecidas las condiciones óptimas de trabajo para la determinación rápida de la identidad antigénica del PsVi y del TD presentes en IFA y formulaciones vacunales conjugadas.

Palabras clave: vacunas conjugadas, ensayo de identidad, Dot Blot, *Salmonella* Typhi.

Introducción

Salmonella entérica, serovar Typhi es un Bacilo Gram negativo no encapsulado, causante de enfermedades sistémicas como la fiebre tifoidea o fiebre entérica, que puede llevar a la muerte si no es tratada debidamente, lo cual constituye un problema severo de salud pública en casi todo el mundo (1).

Las vacunas empleadas para la inmunoprofilaxis de la fiebre tifoidea en la actualidad son: la vacuna atenuada de *S. Typhi* administrada oralmente y la de polisacárido purificado, que ha sido la más usada y de la cual existen varias en el mercado (2-4).

Sin embargo, las vacunas polisacarídicas, si bien son inmunogénicas en individuos inmunocompetentes mayores de 2 años de edad, la protección inducida por las mismas no es de larga duración, ni se observa efecto de refuerzo. Por esta razón, la estrategia actual es conjugar los polisacáridos a proteínas, adquiriendo así estos T-dependencia y por tanto desarrollar una

respuesta más eficiente. De esta forma, estas vacunas inducen memoria inmunológica, se incrementa la duración e intensidad de la respuesta inmune, la avidez de los anticuerpos generados y se hacen inmunogénicas incluso en niños pequeños (5, 6).

Los organismos regulatorios internacionales han establecido como uno de los requisitos para la producción de vacunas conjugadas la identidad de los antígenos presentes en la formulación. Esta evaluación se realiza por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o mediante técnicas inmunoquímicas, entre ellas los immunoblotting se destacan por su alta especificidad y sensibilidad, además de su relativo bajo costo y fácil realización (7).

EL Dot Blot es una técnica usada normalmente en estudios cualitativos, donde se utiliza como soporte sólido el papel de nitrocelulosa.

Las proteínas son adsorbidas pasivamente en la membrana; se agregan sucesivamente anticuerpos

* Licenciada en bioquímica y biología molecular. Departamento de Análisis, Laboratorio Inmunoquímica. Especialista CITMA.

específicos contra la proteína de interés y conjugados anti-inmunoglobulinas ligados a una enzima. La adición del sustrato específico permite la visualización en el papel (8).

El presente trabajo tiene como objetivo la optimización de un ensayo de identidad para el polisacárido capsular de *S. Typhi* (PsVi) y de la proteína portadora toxoide diftérico (TD) tanto en el ingrediente farmacéutico activo (IFA) como en la formulación final.

Materiales y Métodos

IFAs y vacunas

Fueron evaluados varios lotes de IFAs (13.02; 13.03; 13.04; 13.05) que contenían el conjugado PsVi-TD y varios lotes de una formulación vacunal (402; 405; 407; 408); todos obtenidos en el Instituto Finlay de Vacunas (La Habana, Cuba) en condiciones de buenas prácticas de producción. Las IFAs fueron preparadas a una concentración de 125 µg/mL y las formulaciones vacunales se utilizaron sin dilución previa.

Anticuerpos monoclonales

Se utilizaron AcM específicos anti-PsVi (4G3E11) y anti-TD (3G3F3) obtenidos en el laboratorio de anticuerpos monoclonales del Instituto Finlay de Vacunas.

Dot Blot

Las muestras se aplicaron manualmente en membrana de nitrocelulosa (MNC) de 0,45 µm de tamaño de poro (Bio-Rad, EUA) y se dejó hasta que se secase. Se realizaron varios Dot Blot con los siguientes objetivos: determinar el volumen de aplicación óptimos para las IFAs; determinar las concentraciones óptimas de los AcMs (anti-PsVi y anti-TD); Determinar el tiempo de incubación y por último, probar las condiciones establecidas en la identidad del PsC Vi en varios lotes de IFAs y vacunas (9).

Determinar el volumen de aplicación óptimo para las IFAs

Para este estudio fueron inmovilizados en dos tiras de MNC 2, 5 y 10 µL de la IFA 13.04, ajustada previamente a una concentración de 125 µg/mL; una de las tiras se incubó con AcM anti-PsVi y la otra con el AcM anti-TD. La concentración de los AcM empleados en este ensayo fue de 5 µg/mL. El resto de la técnica siguió el procedimiento ya descrito.

Determinar las concentraciones óptimas de los anticuerpos monoclonales

Como muestra antigénica se utilizó el mismo lote de IFA empleada en los acápites anteriores (13.04). Se aplicaron en 6 tiras, volúmenes de 2,5 y 10 µL de la IFA a 125 µg/mL. El paso del bloqueo se realizó con leche descremada (LD) al 3% en Solución Salina Tamponada con Fosfatos 0,15M, pH 7,2 (SSTF), mientras que la incubación y lavados se realizaron igual a lo descrito en el acápite anterior.

Las tiras fueron divididas en dos grupos de tres tiras (una tira para cada una de las concentraciones de los AcM estudiados). Se utilizaron tres concentraciones diferentes para cada AcM (2,5; 5 y 10 µg/mL para el AcM anti-PsVi y 2, 5 y 10 µg/mL para el AcM anti-TD todos en LD al 1% en SSTF). El resto de la técnica se realizó según lo descrito en el acápite anterior.

Determinación del tiempo de incubación óptimo

Fueron aplicados en cuatro tiras de MNC 2,5 y 10 µL de la IFA 13.04, ajustada previamente a una concentración de 125 µg/mL. Dos tiras se utilizaron para el estudio con el AcM anti-PsVi y las otras dos con el AcM anti-TD. Posteriormente se procedió al proceso de bloqueo de los sitios activos remanentes con LD al 3% en SSTF durante 30 o 15 min a 37°C. Después de tres lavados de 5 min cada uno con SSTF/Tween 20 al 0,05%, fueron incubadas con el AcM correspondiente en cada caso (2,5 y 2 µg/mL para el AcM anti-PsVi y anti-TD respectivamente, ambos diluidos en LD al 1% en SSTF, durante 30 o 15 min a 37 °C. Seguidamente las membranas fueron lavadas en la solución de lavado de la misma forma antes descrita. Posterior a los lavados, las MNC fueron incubadas a 37 °C con anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma, USA), a una dilución de 1:5000 en LD al 1% en SSTF, durante 30 o 15 min. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min y se procedió al revelado, para lo cual se cubrió cada tira con SSTF/3,3-tetrahidrocloro diaminobenzidina (DAB) al 0,04% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0,5%, durante 10 min. La reacción se detuvo realizando varios cambios con agua destilada.

Prueba de identidad del polisacárido Vi de *S. Typhi* y del toxoide Diftérico en lotes de IFAs y vacunas

Una vez que contamos con todos los parámetros de la técnica ajustados, escogimos cuatro lotes de IFAs (13.02; 13.03; 13.04; 13.05) que contenían el conjugado PsVi-TD y varios lotes de una formulación vacunal con la

misma composición (402; 405; 407; 408). Se aplicaron 5 μL de las IFAs, ajustadas a una concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 5 μL de las formulaciones vacunales directamente del bulbo. Una tira se evaluó contra el AcM anti-PsVi y la otra con el AcM anti-TD. El resto de la técnica se realizó aplicando los resultados obtenidos en los acápites anteriores.

Digitalización de las imágenes

Las imágenes de los Dot Blot fueron digitalizadas utilizando un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, EUA) con software de captura (Quantity One, Bio-Rad, EUA).

Resultados y Discusión

La necesidad de conjugar el PsVi para mejorar su respuesta inmune, hizo necesario establecer técnicas analíticas para determinar su identidad. Debido a las bajas concentraciones a las que estos antígenos se encuentran en las formulaciones vacunales, las técnicas más empleadas han sido las de RMN, que determina su estructura pero que puede resultar complejo y caro, y las inmunoenzimáticas donde se emplean AcM específicos; estas últimas son más sencillas pero pueden ser un poco extensas (9-12).

Determinación del volumen de aplicación óptimo para las IFAs

Como se puede observar (Fig. 1), para los tres volúmenes de aplicación de la IFA 13.02, se aprecia una mancha de igual intensidad y proporcional al volumen aplicado para los dos antígenos en estudio. Teniendo en cuenta que los volúmenes evaluados son muy pequeños y que estos corresponden a cantidades de hasta 0,25 μg de antígenos, es posible realizar el ensayo con mucha menos cantidad de muestra (9-12), lo cual constituye una ventaja para el laboratorio. No fueron estudiados volúmenes mayores ya que al aplicar la muestra en la MNC de forma manual, esta difunde en la membrana y pueden llegar a unirse, lo que pudiera producir falsos positivos. De los tres volúmenes evaluados se escogió 5 μL como volumen óptimo, porque para aplicar 10 μL se necesita un tiempo adicional en el secado después de su aplicación y por ser 2 μL un volumen tan pequeño que pudiera introducir errores.

Determinación de las concentraciones óptimas de los anticuerpos monoclonales

Teniendo como referencias otros estudios de concentración óptima del AcM anti PsVi (11) se decidió

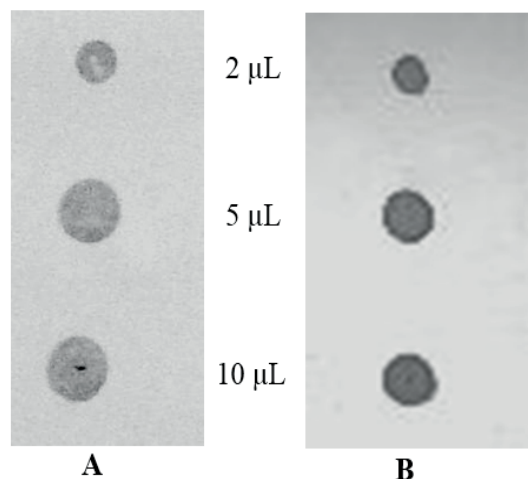


Fig. 1. Evaluación del volumen de aplicación. A: AcM anti-PsVi; B: AcM anti-TD; 2,5 y 10 μL , volumen de aplicación de las muestras.

evaluar 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como concentración mínima, por otro lado del AcM anti TD no se conocían reportes por lo cual teniendo en cuenta resultados preliminares en el laboratorio se decidió evaluar 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como concentración mínima. Los resultados obtenidos de este estudio son mostrados en la Figura 2.

En cada caso, las tres concentraciones de AcM estudiadas dieron resultados positivos, incluso sin mucha diferencia en la intensidad del color entre las tres concentraciones evaluadas y para cada antígeno, por lo cual podemos afirmar que 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el AcM anti-TD y 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el AcM anti-PsVi son suficientes para realizar el ensayo.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por González-Aznar E. y cols. (10) quienes obtuvieron resultados similares al evaluar este AcM, con la diferencia que en su trabajo emplearon condiciones de incubación de 1h a 37 $^{\circ}\text{C}$ para el AcM y para el conjugado anti-IgG utilizado, mientras los resultados mostrados en la Figura 2 fueron obtenidos con 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ para todas las incubaciones, excepto para el revelado. De esta forma optimizamos la técnica, ya que se obtienen resultados similares con menor cantidad de antígenos y tiempo.

La concentración, tanto de la muestra (conjugado Vi-TD) como del AcM es un factor importante a tener en cuenta, pues esta determina la formación del complejo Ag-Ac, es decir, en tanto aumente la formación del complejo, mayor será el reconocimiento por parte del conjugado anti IgG-peroxidasa y por tanto mayor será la intensidad del color de la mancha obtenida (11). Otras

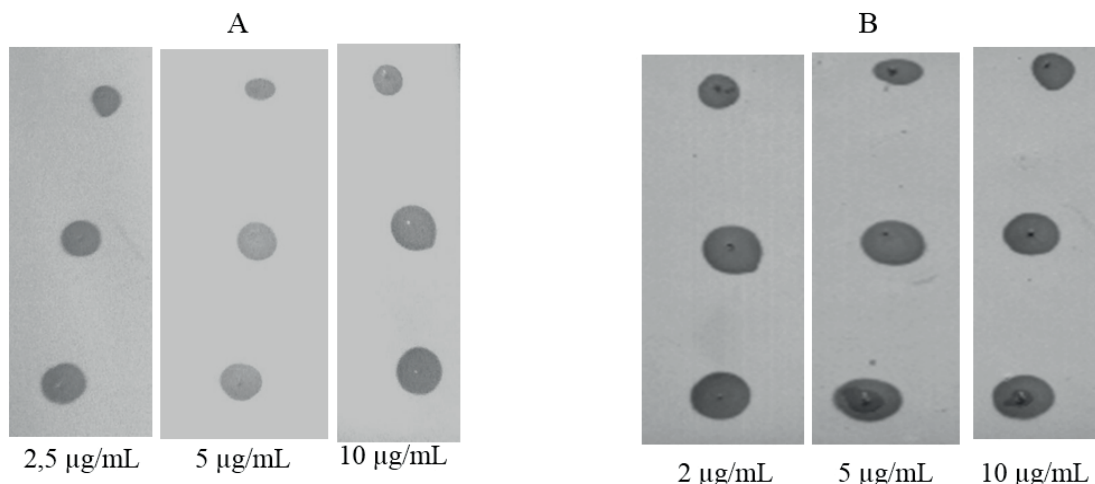


Fig. 2. Evaluación de la concentración óptima de AcM. A: AcM anti-PsVi. B: AcM anti-TD, Los valores de concentración que aparecen son referidos a las concentraciones de AcM estudiadas en cada caso. En cada caso se aplicaron 5 µL de la IFA en estudio.

razones son, el costo de los AcM, la complejidad de su obtención y su utilidad como herramienta para los ensayos analíticos, es importante entonces que se utilice la concentración mínima a la cual funcione el ensayo.

Estudio del tiempo de incubación

El tiempo de incubación es un parámetro a tener en cuenta para la optimización de la técnica ya que este constituye una de las desventajas de las técnicas inmunoenzimáticas al hacerla más engorrosa. Para ambos tiempos estudiados se observaron manchas oscuras con intensidad similar, representativas de una respuesta positiva a la presencia en las muestra de los antígenos estudiados; por tanto, se puede realizar con tiempos de incubación de 15 min sin que por esto se vea afectado el resultado (Fig. 3). Este resultado constituye una ventaja ya que no se tienen

reportes de tiempos de incubación tan cortos para técnicas de este tipo, de esta forma se elimina una de las principales desventajas del método.

Prueba de identidad del PsVi y del TD en lotes de IFAs y vacunas

Como ensayo final se probó la funcionalidad de las condiciones establecidas en la identidad de varios lotes de IFAs y formulaciones vacunales (Fig. 4).

Como se puede observar todas las muestras dieron resultados positivos, lo cual permitió asegurar que con las condiciones establecidas en este trabajo se puede determinar la identidad antigénica en IFAs y formulaciones vacunales, quedando establecido un método para determinar la identidad de las mismas.

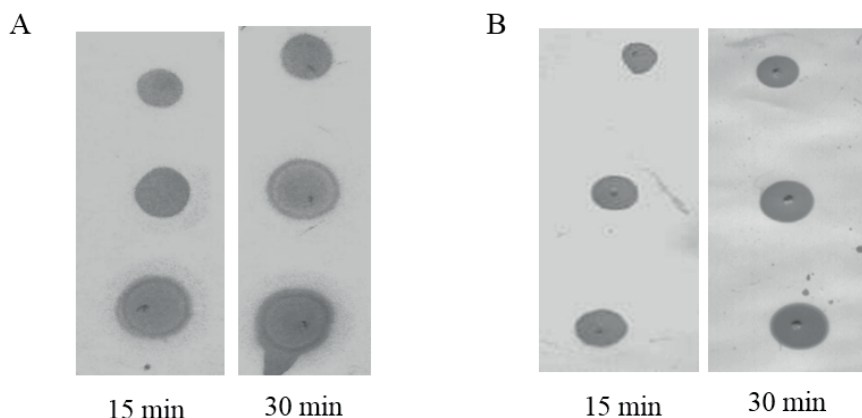


Fig. 3. Evaluación del tiempo de incubación para los dos antígenos con las condiciones antes escogidas. A: AcM anti-PsVi. B: AcM anti-TD.

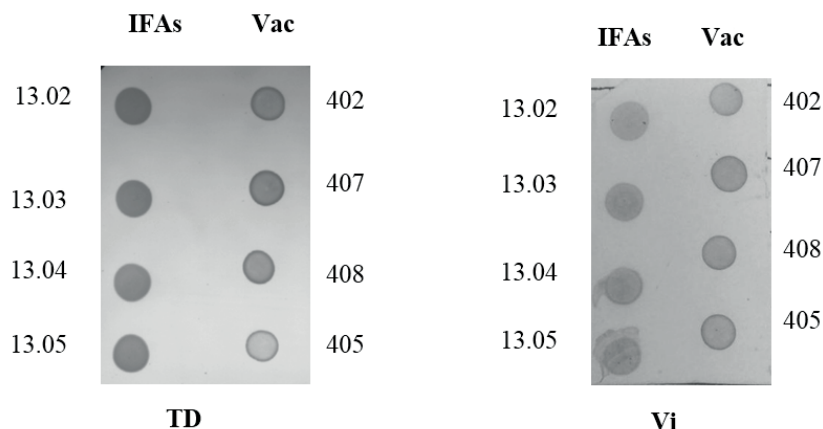


Fig. 4. Evaluación de varios lotes de IFAs y vacunas (Vac) para los dos antígenos con las condiciones establecidas: (5 μ L volumen de aplicación; 15 min tiempo de incubación; 2 y 2,5 concentración de AcM para TD y Vi respectivamente). 402, 405, 407 y 408, lotes de formulaciones vacunales estudiadas; 13.02, 13.03, 13.04 y 13.05, lotes de IFAs.

Referencias

- Hart PJ, O'Shaughnessy CM, Siggins MK, Bobat S, Kingsley RA, Goulding DA, et al. Differential Killing of *Salmonella enteric* Serovar Typhi by Antibodies Targeting Vi and Lipopolysaccharide O:9 Antigen. Plos One. 2016;11(1). Disponible en: <http://researchonline.lshtm.ac.uk/2534165/1/pone.0145945.pdf>.
- Cabrera O, Cuello M, Soto SR, Pérez O, Taboada CM, Fariñas M, et al. Preparación y evaluación de conjugados de polisacárido Vi de *Salmonella* Typhi con toxoide tetánico. VacciMonitor 2002;11(2):6-9
- NCBI Vaccines for preventing typhoid fever [database on the internet]. Bethesda: NCBI; c2000. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10796623>.
- Keddy KH, Klugman KP, Hansford CF, Blondeau C, Bouveret-Le CN. Persistence of antibodies to the *Salmonella* Typhi Vi capsular polysaccharide vaccine in South African school children ten years after immunization. Vaccine 1999;17:110-3.
- Lindberg AA. Glicoprotein conjugate vaccine. Vaccine 1999;17:28-36.
- Chinnasami B, Mangayarkarasi V, Prema A, Sadasivam K, Davis MJ. Safety and Immunogenicity of *Salmonella* Typhi Vi conjugate vaccine (PedaTyphTM) in children up to five years. International Journal of Scientific and Research Publications 2013;3(2):1-5.
- World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization, 60th report. Geneva: WHO; 2013.
- Lomonte, B. Manual de Métodos Inmunológicos. San José: Universidad de Costa Rica; 2007.
- Cabrera O, Pisonero M, Rodríguez M, Pérez R, González E, Pedroso J, et al. Dot blot para identidad del polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 y toxoide tetánico en vacunas conjugadas. Revista Cumbres 2016;2(2):31-7.
- González-Aznar E, Otero-Alfaro O, Amín-Blanco N, Reyes-López F, Cuello-Pérez M, Ramírez-Bencomo F. Producción, purificación y caracterización del AcM contra polisacárido capsular Vi de *Salmonella Typhi* y su aplicabilidad en ensayos de identidad. Revista Bioprocesos 2015;1(3):1-12.
- González-Aznar E, Otero-Alfaro O, Cabrera-Blanco O, Ramírez-Bencomo F, Fajardo-Sánchez A, Mandariote-Llanes A, Cuello-Pérez M. Evaluación de los Anticuerpos Monoclonales anti-polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupos A, C, Y, W y X para su uso en los ensayos de identidad. VacciMonitor 2015;24(2):64-70.
- Cabrera-Blanco O, Pisonero-Triana M, Rodríguez-Bejerano M, Pérez-Nicado R, González-Aznar E, Rodríguez-Noda LM, et. al. Dot Blot para determinar la identidad antigénica en vacunas conjugadas contra *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F. VacciMonitor 2017;26(1):1-7.

Rapid determination of the identity of *Salmonella* Typhi polysaccharide and diphtheria toxoid in conjugate vaccines

Abstract

Vi polysaccharide from *Salmonella* Typhi is a T-independent antigen that has proven to be protective in young adults. However, it has been conjugated to proteins in order to confer T-dependent properties to the polysaccharide, and improving the antibody response. The regulatory agencies require knowing the identity of antigens included in vaccines. The Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and serological techniques are recommended. The aim of this work was to establish the optimal working conditions of a Dot Blot that would allow to determine quickly the identity of the antigens in conjugate vaccines against *S. Typhi*. The incubation times, optimum concentrations of monoclonal antibodies (MAb) and active pharmaceutical ingredient (API), as well as optimum application volumes for APIs and vaccine formulations were studied for both, PsVi and diphtheria toxoid (DT). It was proven that 5 μ L of samples of the monovalent conjugates were sufficient at a dilution of 1/10 (vol/vol) and an equal volume for the vaccine formulations. It was demonstrated that the concentration of 2.5 μ g/mL for the MAb against PsVi and 2 μ g/mL for the MAb against DT were suitable. The incubation times were adjusted to 15 min with incubation at 37 °C. It was established a simple and rapid method for the specific identification of PsVi and DT present in API and conjugate vaccines.

Keywords: conjugate vaccines, identity assay, Dot blot, *Salmonella* Typhi.

Recibido: Noviembre de 2016

Aceptado: Enero de 2017