

Validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica y diftérica en suero de curiel

Oriallys Valle-Corrales* ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6406-0809>
Lucy Herrera-Guada ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0233-902X>
Mario L. Chovel-Cuervo ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6991-7007>
Tahimí Castellanos-Rodríguez ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-7882-1529>
Deborah Cisneros-Sánchez ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-8035-9374>
Yeni Lemus-Molina ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-4100-6345>
Juan F. Nuñez-Osenes ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-2435-5177>
Eduardo Cajuso-Sosa ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-5915-1424>

Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

Autor por correspondencia: ovalle@finlay.edu.cu

Se validó un ensayo serológico inmunoenzimático en fase sólida de tipo indirecto para la cuantificación de antitoxina tetánica y diftérica en suero de curiel, para lo cual se empleó un suero estándar previamente calibrado. La curva de calibración presentó un buen ajuste lineal y paralelismo con las muestras, presentando $R^2 \geq 0,98$ y $CV \leq 10\%$. Los coeficientes de variación en los ensayos de precisión intra e interensayo estuvieron en los intervalos establecidos para cada uno ($\leq 10\%$ y $\leq 20\%$, respectivamente). El ensayo demostró ser específico. La exactitud del método se demostró a través de la correlación entre el ensayo serológico y el ensayo de seroneutralización *in vivo* dosis L+/10/50 para determinar potencia de tétano y dosis Lr/100 para determinar potencia de difteria. Los resultados obtenidos avalan el empleo de este método analítico basado en el principio de las 3Rs (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) para la evaluación de la actividad inmunogénica de vacunas antidiftéricas y antitetánicas.

Palabras clave: antitoxina tetánica; antitoxina diftérica; ELISA; validación.

Introducción

La difteria es una enfermedad infecciosa causada por la toxina diftérica producida por la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*. El tétanos es causado por la acción de la toxina tetánica o tetanospasmina, una potente neurotoxina que es producida durante el crecimiento del *Clostridium tetani*.^(1,2,3) Las toxinas inactivadas con formaldehído se convierten en toxoides: toxoide diftérico (TD) y toxoide tetánico (TT).^(1,4) Actualmente, las vacunas contra la difteria y el tétano se comercializan en forma de vacuna monovalente TT; vacuna bivalente: antidiftérica y antitetánica para niños (DT) y antidiftérica y antitetánica para adultos (dT); o combinada con otros antígenos: *Bordetella pertussis* de células completas (wP), *Bordetella pertussis* acelular

(aP), *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), virus de la hepatitis B (HB), virus de la polio (IPV).^(5,6)

Aunque estas enfermedades se encuentran prácticamente erradicadas en muchos países debido a la vacunación generalizada de la población infantil, la disminución parcial de la inmunidad y la falta de dosis de refuerzos pueden contribuir a que todavía persistan en la actualidad, considerándose un grave problema de salud y causa de muerte a nivel mundial.

La inmunidad contra la difteria y el tétano sólo puede obtenerse mediante inmunización activa con TD y TT. La capacidad de neutralización sobre la toxina (tetánica o diftérica) que tiene la antitoxina específica se puede determinar por técnicas *in vivo* e *in vitro*, evaluando los

* Máster en Tecnología y Control de Medicamentos, Especialista de Alta Tecnología en Control de la Calidad. Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

niveles de antitoxina presentes en el suero de animales inmunizados. Las pruebas de neutralización *in vivo* miden directamente la actividad biológica de la antitoxina en animales de laboratorio, son pruebas sensibles y específicas, sin embargo, son muy costosas por el alto número de animales que requieren, necesitan personal altamente entrenado y son cuestionadas éticamente por el dolor y estrés que causan en los animales utilizados.^(7,8,9)

La interacción entre la antitoxina específica y la toxina tetánica o diftérica (o toxoide) puede ser medida por el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA). Esta técnica es simple, sensible, rápida y menos cara que los métodos de neutralización *in vivo*, sin embargo, es menos específica. Por lo tanto, los resultados de las técnicas *in vitro* deben ser interpretados cuidadosamente y verificados contra los métodos de neutralización.⁽⁹⁾

Nos propusimos validar una técnica ELISA para la determinación cuantitativa de las antitoxinas tetánica y diftérica desarrollada en el laboratorio de Materiales de Referencia perteneciente a la Dirección de Control de la Calidad del Instituto Finlay de Vacunas (IFV) como un procedimiento alternativo a los métodos de seroneutralización *in vivo*, que permita conocer la capacidad inmunogénica de las vacunas antidiftéricas y antitetánicas producidas en el IFV.

Materiales y Métodos

Curieles

Se emplearon curieles albinos Duncan - Hartley de 350 a 450 g para la obtención del suero estándar. Los animales fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) debidamente certificados. Los cuartos de los animales se mantuvieron a una temperatura de 22 °C ± 2 °C, una humedad relativa de 65 % ± 5 % y se utilizó un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

La manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos descritos en las normas internacionales y nacionales, establecidos en los Procedimientos Normalizativos de Operación del Laboratorio de Biológicos del IFV, los cuales se rigen por la Regulación 39/04 del CECMED⁽¹⁰⁾ y la Norma Cubana NC ISO/IEC 17025/17.⁽¹¹⁾ La investigación fue

aprobada por el Comité Científico del Área de Control de la Calidad del IFV.

Antígenos

Como antígeno de captura se usaron los toxoides purificados producidos por el IFV (La Habana, Cuba): toxoide tetánico de recubrimiento (TTrec) lote 1/18, con 1.320 unidades de floculación por mL (Lf/mL) y toxoide diftérico de recubrimiento (TDrec) lote 1/18, con 2.700 Lf/mL.

Suero estándar

Se obtuvo un suero hiperinmune inmunizando los curieles con dos dosis de 0,75 mL (t=0 y t=28 días) de la vacuna DT, dosis establecida en el procedimiento de ensayo para determinar la potencia de tétano y difteria en vacunas combinadas (DT y dT). Se realizó el sangrado total de los curieles de forma individual a los 42 días mediante punción en la vena yugular, para ello se anestesiaron los animales con una dosis de tiopental de 20 mg/Kg de peso suministrado por vía intraperitoneal.⁽¹²⁾ La sangre se colectó individualmente y se incubó durante 1 h a 37 °C. Se guardó entre 2-8 °C por un periodo de 24 h, se realizó una mezcla con los sueros individuales obtenidos, mezclando a partes iguales hasta obtener la mayor cantidad de suero posible, lo que permite una mayor duración del suero estándar.

Este suero estándar fue evaluado contra el material de referencia de trabajo (MRT), lote ATTRN (5)/14, previamente calibrado contra la antitoxina tetánica equina 60/013 (NIBSC) para evaluar la actividad antitetánica y con el MRT, lote ADRN (4)/12, calibrado contra antitoxina diftérica equina 12/302 (NIBSC) para determinar la actividad antidiftérica. La actividad obtenida en Unidades Internacionales (UI)/mL se correspondió con 80 unidades de antitoxina para tétano y 16 unidades para difteria.

ELISA

Se sensibilizaron placas para ELISA (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca) con TDrec (1)/18 a una concentración de recubrimiento de 10 Lf/mL, y TTrec (1)/18 a una concentración de recubrimiento de 6 Lf/mL, en solución amortiguadora (carbonato-bicarbonato 0,05

mol/L, pH 9,6); se incubó durante 16 h a 4 °C en cámara húmeda. A continuación, se realizaron tres ciclos de lavado con una solución de agua purificada y Tween 20 al 0,05 %. Luego de aplicar 100 µL de cada dilución del suero de curiel anti DT empleado como curva de calibración: SCuDTcc (1) /18) y muestras en solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7,4, leche descremada al 3 % y Tween 20 al 0,05 %, se incubó 1 h a 37 °C. A continuación, se realizaron tres ciclos de lavado con una solución de agua purificada y Tween 20 al 0,05 %. Posteriormente, se aplicó el conjugado anti-IgG de curiel/peroxidasa de rábano picante (SIGMA) en PBS, incubándose 1h a 37 °C. Al concluir este periodo se realizaron tres ciclos de lavado con una solución de agua purificada y Tween 20 al 0,05 %. Seguidamente, fueron adicionados 100 µL por pocillo del sustrato, diclorhidrato de o-fenilendiamina, en solución de ácido cítrico pH 4 y peróxido de hidrógeno al 30 % y se incubó 30 min a 20-25 °C en oscuridad, deteniéndose la reacción al adicionar 50 µL de ácido sulfúrico 1mol/L. Finalmente, se midió la absorbancia (ABS) a 492 nm en un lector de placas (PR 621 SUMA, Cuba).^(13,14)

Parámetros de validación

El ELISA indirecto para la evaluación de la potencia en vacunas antitetánicas y antidiftéricas se clasifica como ensayo de contenido o potencia y los parámetros de validación recomendados para los métodos incluidos en esta categoría son: linealidad, precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad), exactitud y especificidad. Los métodos alternativos (*in vitro*) requieren de una correlación con los métodos clásicos (en animales) como parte integral del estudio de validación.⁽¹⁵⁾

Linealidad

Se evaluaron cinco muestras de suero que abarcaron niveles altos, medios y bajos de antitoxina, se estudiaron en tres diluciones. El coeficiente de variación (CV) de las concentraciones de las muestras corregidas por el factor de dilución fue usado para determinar el paralelismo. Se determinó el coeficiente de determinación (R^2) de las curvas del suero estándar y de las muestras, debiendo ser mayores o iguales a 0,98.^(15,16)

Precisión intraensayo

Se evaluó la repetibilidad a través del análisis de 10 réplicas de cada suero diluido obtenido, se le realizaron tres diluciones con factor dos y se evaluaron muestras con diferentes concentraciones altas, medias y bajas. Se calculó, para cada dilución, el promedio y el CV de cada muestra considerándose óptimos los CV menores del 10 %.^(15,16)

Precisión interensayo

Para la evaluación de la precisión intermedia se evaluaron por dos analistas cinco muestras de suero con diferentes concentraciones, a cada una se le realizaron tres diluciones seriadas con factor dos, en tres corridas diferentes cada analista, en paralelo se evaluaron el suero estándar (SCuDTcc (1) /18), el suero de curiel empleado como control positivo (SCuDTc+ (1) /18) y el suero de curiel control negativo (SCuc- (1) /18). Se determinó el promedio y el CV interensayo, considerándose óptimos los CV que no superaran el 20 %.^(15,16,17)

Especificidad

Para demostrar la especificidad se evaluaron las diluciones de SCuDTcc (1) /18), SCuDTc+ (1) /18 y de los sueros de animales inmunizados con los placebos de vacunas y muestras controles negativos para ambos antígenos (formulaciones de vacunas sin el antígeno a evaluar).

Se realizaron tres diluciones de cada suero. Se determinó el promedio de las ABS de las muestras evaluadas. El método se consideró específico si las ABS de los placebos y de las muestras utilizadas como controles negativos fueron inferiores al punto más diluido de la curva.^(17,18)

Exactitud. Correspondencia entre el ELISA y la prueba de neutralización *in vivo*

Para comprobar la posible correspondencia entre el ELISA para determinar la concentración de anticuerpos antitetánicos y antidiftéricos y el ensayo de seroneutralización *in vivo* para tétano y difteria, se cuantificaron los niveles de antitoxina por ambos métodos.⁽¹⁸⁾ Para ello se evaluaron 25 sueros obtenidos de la inmunización de los curieles con las vacunas DT y dT, para el ELISA de difteria y 47 sueros obtenidos de

la inmunización de los curieles con las vacunas DT, dT, vax-TET y vax-TET5, para el ELISA de tétano.

Los valores de actividad de las antitoxinas tetánica y diftérica obtenidos por ambos ensayos fueron sometidos a un análisis de regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados. Se consideraron los datos aportados por la prueba de seroneutralización *in vivo* como referencia (variable independiente x). Se calculó la ecuación de mejor ajuste, el coeficiente de correlación (r) y el R^2 . Los valores de antitoxina obtenidos por cada método se compararon con la prueba t de Student para datos pareados. Una p mayor a 0,05 indicó la no existencia de diferencias significativas entre los métodos analizados.^(19,20)

Resultados y Discusión

Curieles

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos.^(2,8)

La linealidad de las muestras se evaluó a través de un estudio de dilución para demostrar que el analito en el suero estándar y las muestras presentan un comportamiento similar, por lo que la dilución de las muestras no debería afectar el resultado final. Las muestras de sueros estudiadas con tres diluciones mostraron, una vez corregidas con el factor de dilución, pequeñas desviaciones del valor observado ($CV \leq 10\%$), que no afectaron el paralelismo respecto a la curva estándar. Los R^2 de la recta de mejor ajuste para cada una de las muestras y la curva de calibración se encontraron por encima y cercanos a 0,98. Este resultado indica el comportamiento lineal del suero estándar y las muestras (Fig. 1).^(15,16)

Las variaciones intraensayo que demuestran la precisión para ambos ELISA se muestran en las Tablas 1 y 2. El ensayo es reproducible con CV menores o alrededor del 10%.^(15,16)

Las variaciones interensayo que demuestran la máxima precisión para ambos ELISA se muestran en las Tablas 3 y 4. El ensayo es preciso con CV menores del 20%.^(15,16,17)

La especificidad es la capacidad que tiene el método para determinar el analito para el cual está diseñado, sin que interfieran otros componentes de la muestra.

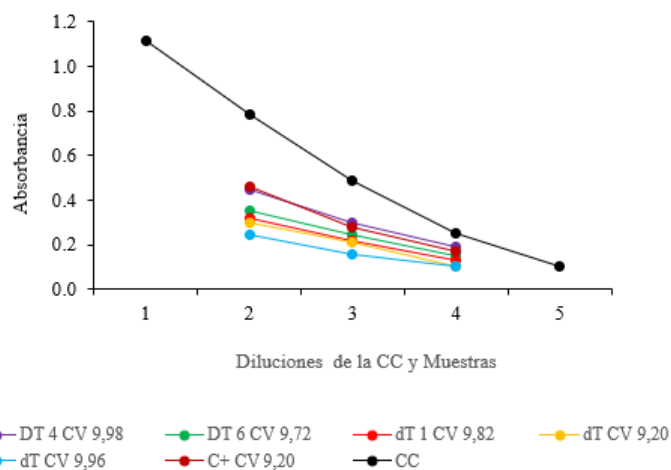
Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la especificidad de cada ensayo. El ELISA de tétano solo detecta IgG antitetánica y el ELISA de difteria IgG antidiftérica. Las ABS obtenidas para las muestras de suero evaluadas de los placebos y muestras controles negativos para ambos ELISA fueron inferiores al punto más diluido de la curva de calibración,⁽¹⁷⁾ obteniéndose valores de ABS por debajo de 0,1, demostrando la especificidad del método, no siendo así para el SCuDTc+ donde los valores de ABS están dentro del rango lineal de la curva.⁽¹⁸⁾

Como puede apreciarse en la Figura 2, en los lotes ensayados, tanto para el componente diftérico como tetánico, el ELISA mostró aceptable correlación con el ensayo de seroneutralización *in vivo*. El coeficiente de correlación r para ambos ELISA mostró valores $\geq 0,80$, lo que indica que existe una asociación significativa entre los valores por ambos ensayos. Estos resultados se corresponden con estudios publicados en la literatura científica internacional, donde se ha evaluado la correspondencia entre el ensayo de potencia *in vitro* y las pruebas de potencia por reto letal o seroneutralización *in vivo* para ambos componentes antigénicos, con correlaciones similares.^(18,19,20)

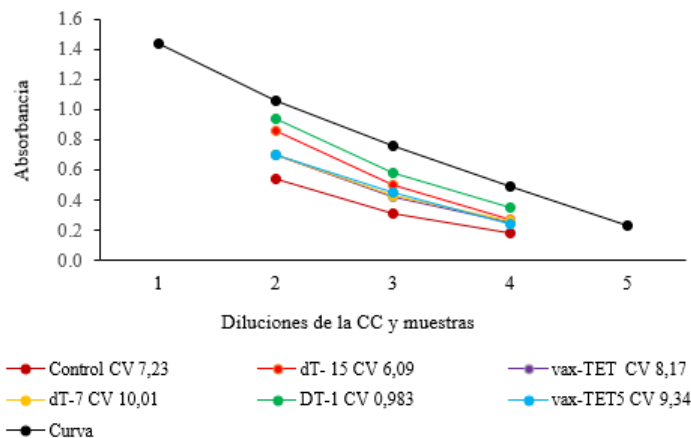
Además, la *t de student* para datos pareados demostró que no existen diferencias significativas con un 95 % de confianza ($p > 0,05$) entre ambos ensayos $p = 0,814$ para el ELISA de tétano y $p = 0,053$ para el ELISA de difteria.^(18,21)

Los resultados obtenidos durante la validación permitieron demostrar de forma documentada la confiabilidad de los ensayos de inmunogenicidad evaluados para determinar la respuesta inmune inducida por vacunas antidiftéricas y antitetánica en suero de curiel. Los ensayos mostraron especificidad, precisión, y una adecuada correlación con los ensayos de seroneutralización *in vivo* dosis L+/10/50 y Lr/100, lo cual garantiza su empleo como método alternativo.

De esta forma el IFV dispone de un método basado en el principio de las 3Rs que resulta más seguro, al



A.



B.

Fig. 1. Ensayo de dilución del ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica y diftérica. A (ELISA difteria) y B (ELISA tétano).

Tabla 1. Precisión intraensayo del ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica.

Muestras	Dilución 1		Dilución 2		Dilución 3	
	X (UI/mL)	CV (%)	X (UI/mL)	CV (%)	X (UI/mL)	CV (%)
1	26,718	8,43	24,249	10,64	24,785	9,77
2	20,284	5,95	17,649	9,81	18,984	10,02
3	9,194	11,51	8,422	10,46	9,183	9,89
4	52,360	7,528	54,190	8,97	53,432	8,02
5	11,296	5,62	11,680	5,99	11,371	5,01
6	54,728	6,27	54,284	4,06	56,481	9,79
7	12,776	10,97	12,431	10,18	12,764	10,55
8	40,665	4,40	39,534	2,35	40,078	5,65
9	12,776	10,970	12,544	9,110	12,764	10,55

X: Promedio. CV: Coeficiente de variación.

Tabla 2. Precisión intraensayo del ELISA para la cuantificación de antitoxina diftérica.

Muestras	Dilución 1		Dilución 2		Dilución 3	
	X (UI/mL)	CV (%)	X (UI/mL)	CV (%)	X (UI/mL)	CV (%)
1	8,116	9,31	7,507	7,86	7,396	9,97
2	6,024	4,73	5,982	7,53	5,770	8,59
3	4,737	7,24	5,137	9,40	5,413	9,63
4	2,085	8,20	2,399	9,44	2,626	9,70

X: Promedio. CV: Coeficiente de variación.

Tabla 3. Precisión interensayo del ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica.

Muestras	Analista 1 X (UI/mL)	Analista 2 X (UI/mL)	Promedio X (UI/mL)	DE	CV (%)
dT15	59,843	63,194	61,519	2,370	3,85
dT7	30,775	25,588	28,182	3,668	13,02
vax-TET 6	31,160	25,236	28,198	4,189	14,86
vax-TET-5-5	19,769	18,486	19,127	0,907	4,74
DT1	15,407	14,396	14,901	0,715	4,80
C+	25,299	23,229	24,264	1,464	6,032

X: Promedio. DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación.

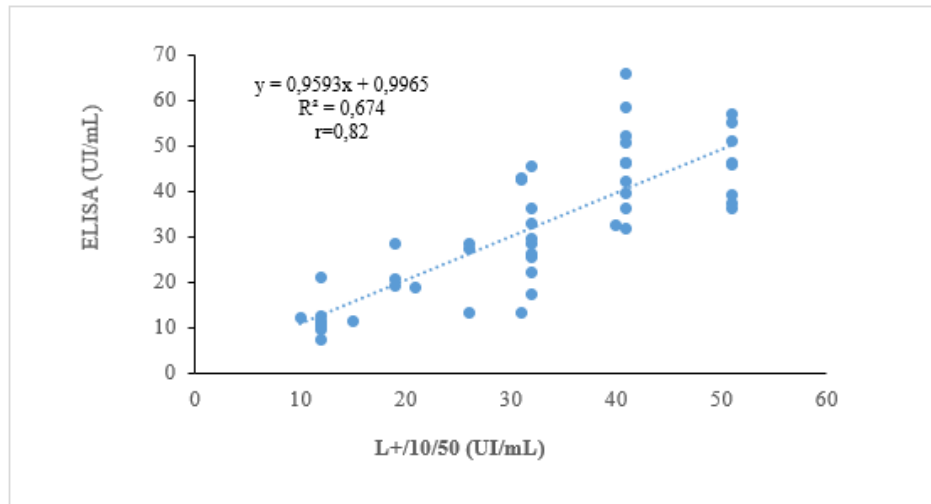
Tabla 4. Precisión interensayo del ELISA para la cuantificación de antitoxina diftérica.

Muestras	Analista 1 X (UI/mL)	Analista 2 X (UI/mL)	Promedio X (UI/mL)	DE	CV (%)
dT 1	3,846	4,517	4,298	0,640	14,89
dT 12	2,265	2,269	2,267	0,002	0,097
dT 14	1,927	2,216	2,072	0,205	9,887
DT 4	7,009	6,464	6,737	0,386	5,727
DT 6	4,340	3,964	4,152	0,266	6,397
C+	3,886	4,022	3,954	0,096	2,440

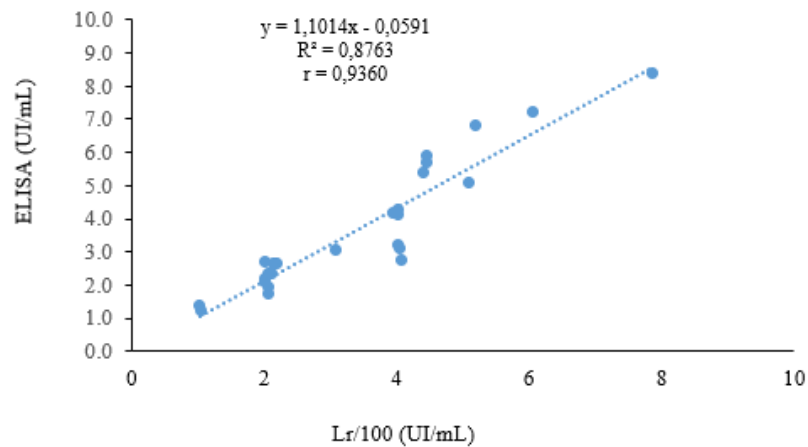
X: Promedio. DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación.

excluir el uso de microorganismos virulentos o toxinas y disminuir el dolor y estrés causado a los mismos, cuestionamientos éticos relacionados con la experimentación y uso de animales de laboratorio.⁽⁷⁾ De igual modo, el ensayo serológico es considerado un método menos variable que el ensayo de seroneutralización *in vivo*, que posee una muy alta variabilidad intrínseca como toda prueba en animales,⁽⁸⁾

con un menor número de animales empleados en el ensayo, reduciendo así los costos y los tiempos para los procesos de liberación, estudios de estabilidad, validación de las técnicas analíticas de las vacunas y producción de los MRT. Por último, la sustitución de las etapas de seroneutralización *in vivo* por el ELISA permite un incremento en el procesamiento de muestras, así como en la capacidad de cuantificación de los



A.



B.

Fig. 2. Análisis de regresión lineal entre los valores de actividad de antitoxina obtenidos por el ELISA y la prueba de neutralización: A. (L+/10/50) en 47 muestras de suero. B. (Lr/100) en 25 muestras de suero.

valores de actividad biológica. Con este método se contribuye al estado del arte en el desarrollo de métodos alternativos para la determinación de la potencia de vacunas.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

Oriallys Valle-Corrales: administración del proyecto, conceptualización de la metodología y el análisis de

datos, realizó los experimentos diseñados, fue responsable de la redacción del borrador original y la redacción del documento final.

Lucy Herrera-Guada: conceptualización de la metodología, análisis de datos y supervisión del proyecto.

Mario L. Chovel-Cuervo: conceptualización de la metodología, análisis de datos y supervisión del proyecto.

Tahimí Castellanos-Rodríguez: realizó los experimentos diseñados.

Deborah Cisneros-Sánchez: supervisora de los experimentos diseñados.

Yeni Lemus-Molina: curación de datos y análisis formal y revisión del artículo.

Juan F. Nuñez-Osenes: metodología y revisión del artículo.

Eduardo Cajuso-Sosa: ejecución de ensayos y manejo de los animales empleados.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

Referencias

1. Hernández L. Desarrollo de un ensayo serológico, ELISA en curiel, para evaluar la actividad inmunogénica de vacunas antidiftéricas. [Tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas]. La Habana: IFAL-UH; 2019.

2. www.paho.org [Internet]. Washington DC: OPS; c2021-04. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/difteria>. (Consultado en línea: 3 abril, 2021).

3. www.who.int [Internet]. Ginebra: OMS; c2018-05. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tetanus>. (Consultado en línea: 9 mayo, 2018).

4. Sheppard AJ, Knight PA, inventors. Seqirus Vaccines Ltd. Procedimiento de producción de una vacuna antitetánica. Patente española ES 2 157 219 T5. 16 agosto 2001. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/ES2157219T5/es>. (Consultado en línea: 5 de septiembre 2023).

5. Comité Asesor de Vacunas de la Agencia Española de Pediatría (AEP). Difteria, Tétanos, Tos Ferina (DTP) [monografía en internet]. Madrid: AEP; 2003. Disponible en: https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/difteria_tetanos_tosferina.pdf. (Consultado en línea: 4 de mayo 20)

6. www.svpediatrica.org [Internet]. Caracas: Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría; c2018-04. Disponible en: <http://www.svpediatrica.org/secciones/publicaciones/tipsdevacunas/documento/?year=2016&month=9>. (Consultado en línea: 3 abril, 2019).

7. Chovel ML. Base científica del desarrollo de los métodos alternativos para el control de vacunas como parte ilustrativa de la evolución y la dinámica de la ciencia. Anuario científico del CECMED. 2005(1):8-15.

8. Landys-Chovel M. Métodos alternativos como parte de las nuevas tendencias en el control de calidad de vacunas.

VacciMonitor. 2018; 27(3):110-8. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v27n3/vac05318.pdf>. (Consultado en línea: 3 de abril 2021).

9. Ochoa RF, Martínez JC, Fajardo ME, Alvarez E, Estrada E, García AM, et al. Validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano. VacciMonitor. 2000;9(4):16-21. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v9n4/vac034000.pdf>. (Consultado en línea: 3 de abril 2021).

10. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) Regulación No. 39/04 Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiente. La Habana: CECMED; 2005.

11. ISO/IEC 17025: 2017. Requisitos Generales para la competencia de los Laboratorio de ensayo y calibración. Geneva: ISO; 2018. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>. (Consultado en línea: 3 de abril 2021).

12. Servicio de Experimentación Animal Unidad SEA-ELX. Guía Anestesia y Analgesia en Cobayas. Alicante: Universidad Miguel Hernández; 2011. Disponible: <https://sea.umh.es/files/2011/12/2223-guia-anestesia-y-analgesia-en-cobayas.pdf>. 2011. (Consultado en línea: 3 de abril 2021).

13. World Health Organization. Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines. Immunization, Vaccines and Biologicals. Ginebra: World Health Organization; 2013. Disponible en: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/80681/WHO_IVB_11.11_eng.pdf. (Consultado en línea: 3 de abril 2022).

14. Quintilio W, Kapronezai J, Alessandro de Freitas F. Correlation between ToBI test and in vivo titration for diphtheria and tetanus. Biologicals. 2015;43(1):55-61. doi: <https://10.1016/j.biologicals.2014.10.001>.

15. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Regulación No. 37-2012 Buenas Prácticas para Laboratorio de Control de Medicamentos. La Habana: CECMED; 2012. Disponible en: https://www.cecmec.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/reg_37-2012_buenas_practicas_lab_opt.pdf. (Consultado en línea: 3 de abril 2021).

16. Ochoa RF. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. La Habana: Finlay Ediciones; 2008.

17. Ochoa RF. Técnicas inmunoenzimáticas en el desarrollo clínico de vacunas. La Habana: Finlay Ediciones; 2013.

18. Ontivero I. Establecimiento de un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG antitetánicos en suero de curiel. [Tesis de Maestría]. La Habana: IFAL-UH; 2010.

19. 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):277-9.
20. Rodríguez O, García G, Izquierdo M, Quintana M, Mar JL. Ensayo de potencia *in vitro* para la vacuna cubana recombinante contra la hepatitis B. *Biotecnología Aplicada* 2001;18:154-8.
21. ISO. Guía 35 Reference materials-General and statistical principles for certification. Geneva: ISO; 2006.

Validation of an ELISA for the quantification of tetanus and diphtheria antitoxin in guinea pig serum

Abstract

It was validated an indirect solid phase immunoenzymatic serological assay for the quantification of tetanus and diphtheria antitoxin in guinea pig serum; a previously calibrated standard serum was used. The calibration curve presented a good linear fit and parallelism with the samples, showing $R^2 \geq 0.98$ and $CV \leq 10\%$. The coefficients of variation in the intra- and inter-assay precision tests were within the intervals established for each one (≤ 10 and $\leq 20\%$, respectively). The assay proved to be specific. The accuracy of the method was demonstrated through the correlation between the serological assay and the *in vivo* seroneutralization assay dose L+/10/50 to determine potency of tetanus and dose Lr/100 to determine potency of diphtheria. The results obtained support the use of this analytical method based on the 3Rs principle (Reduction, Refinement and Replacement) for the evaluation of the immunological activity of vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids.

Keywords: tetanus antitoxin; diphtheria antitoxin; ELISA; validation.

Recibido: 20 de agosto de 2024

Aceptado: 27 de enero de 2025