

INVESTIGACIÓN

Identidad de la vacuna contra *Streptococcus pneumoniae* "Quimi-Vio" mediante la técnica Dot Blot empleando los anticuerpos monoclonales contra los polisacáridos capsulares 1,5, 6B, 14 y 19F de la bacteria.

Identity of the "Quimi-Vio" *Streptococcus pneumoniae* vaccine using the Dot Blot technique using monoclonal antibodies against the capsular polysaccharides 1,5, 6B, 14 and 19F of the bacterium.

Elizabeth González Aznar¹, Rubén Adonis Cabrera Arias¹, Fidel Ramírez Bencomo¹, Abel Roscoe Fajardo Sánchez¹ y Reinaldo Acevedo Groguez¹

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.7

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae (neumococo) constituye una de las principales causas de enfermedades infecciosas bacterianas, particularmente en niños menores de 2 años de edad. Basadas en el polisacárido capsular (PsC), su principal factor de virulencia, existen dos tipos de vacunas aprobadas para uso en humanos: las vacunas polisacáridicas planas y las vacunas polisacáridicas conjugadas. Quimi-Vio, la vacuna antineumocócica cubana, pertenece al segundo grupo y está compuesta por los PsC de los siete serotipos de mayor incidencia y circulación en Cuba (1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23F). El objetivo de este trabajo fue realizar el ensayo de identidad de la vacuna cubana Quimi-Vio empleando los AcM contra los PsC 1, 5, 6B, 14, y 19F de Sp obtenidos recientemente en el Instituto Finlay de Vacunas, teniendo en cuenta que los Ensayos de identidad de las vacunas son requisito indispensable para la liberación final de los lotes. La técnica empleada para la realización del ensayo de identidad de Quimi-Vio fue el *Dot Blot*, donde empleando membrana de Nitrocelulosa se realizó la captura de tres lotes de vacuna Quimi-Vio y como control positivo de la técnica los respectivos PsC de los serotipos 1, 5, 6B, 14, y 19F sin conjugar y una vacuna comercial Prevenar-13. Para la identidad de los PsC de neumococo se emplearon los respectivos AcM a una concentración de 10µg/mL y como segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa teniendo en cuenta que los AcMs empleados son murinos. Cada AcM fue capaz de identificar de forma altamente específica al PsC homólogo (mismo serotipo), tanto en su forma no conjugada y monovalente como en el contexto de las vacunas Quimi-Vio y Prevenar 13V, donde además de estar conjugado al TT se encuentra mezclado con otros PsC de forma multivalente. La técnica *Dot Blot* empleando los AcMs contra los PsC serotipos 1, 5,6B, 14 y 19F permite identificar de forma específica cada PsC en la formulación multivalente, por lo que puede ser utilizada para el ensayo de identidad de la vacuna Quimi-Vio, garantizando así la liberación de lotes y control de la calidad de la misma.

Palabras claves: Ensayo de Identidad, *Dot Blot*, Vacunas antineumocócicas, Anticuerpos Monoclonales.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae (Sp) is one of the major causes of bacterial infectious diseases, particularly in children under 2 years of age. There are two types of vaccines approved for human use: polysaccharide vaccines and polysaccharide conjugate vaccines. Quimi-Vio, the Cuban pneumococcal vaccine belongs to the second group and is composed by the PsC of the seven serotypes with the highest incidence and circulation in Cuba (1, 5, 6B, 14, 18C, 19F and 23F). The objective of this work was to carry out the identity test of the Quimi-Vio vaccine using the monoclonal antibodies (MAbs) against PsC 1, 5, 6B, 14, and 19F of Sp obtained recently at the Finlay Institute of Vaccines. The technique proposed for the identity test was *Dot Blot*. The first step consisted in selecting the optimum capture and detection concentrations of PsC and MAb respectively. For the identity test three batches of Quimi-Vio vaccine were evaluated and as positive controls of the technique PsC of the five serotypes and the commercial vaccine Prevenar-13 were used. 100 µL/well was applied, equivalent to 0.4 µg of PsC/well and the MAbs were used at 2.5 µg / mL concentrations selected as optimal. For all concentrations of PsC evaluated for capture there was recognition (signal) with all concentrations of MAb used, even with the minimum concentration of PsC and MAb employed (120 ng/mL and 2.5 µg/mL). In the identity test each MAb was able to identify specifically the homologous PsC (same serotype), in its non-conjugated and monovalent form, and in the context of the Quimi-Vio and Prevenar 13V vaccine, where PsC are conjugated to tetanus toxoid and mixed with other PsC in multivalent form. The *Dot Blot* technique, using the MAbs against the PsC serotypes 1, 5,6B, 14 and 19F can be used for the identity test of Quimi-Vio vaccine, assuring that in a specific way, the PsC conjugates present in the multivalent formulation were identified.

Key words: Identity Assay, Monoclonal Antibodies, Antineumococcal Vaccines, *Dot Blot*

¹Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Departamento de Evaluación Biológica, Área de Investigaciones, Instituto Finlay de Vacunas. A.P. 16017, La Habana Cod. 11600, Cuba.

Autor de correspondencia:elygonzalez@finlay.edu.cu

Introducción

Streptococcus pneumoniae (*Sp*), es una bacteria Gram Positiva, cuyo hábitat natural es la nasofaringe humana, encontrándose que entre el 5-10% de los adultos y el 20-40% de los niños son portadores asintomáticos. Esta bacteria se trasmite de persona a persona a través de gotas de saliva y el contagio aumenta en espacios cerrados, lo que hace que los círculos infantiles y hogares de ancianos sean lugares de alta diseminación de la bacteria¹.

La infección por *Sp* puede presentarse con muchas manifestaciones clínicas incluyendo meningitis, septicemia, bacteriemia, neumonía, otitis media aguda y sinusitis. Sin embargo, se reconoce sobre todo como el principal agente etiológico de Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC). La NAC afecta principalmente a niños (lactantes y hasta 2 años) y ancianos. La infección neumocócica causa cada año aproximadamente 14.5 millones de casos de enfermedad neumocócica invasiva (ENI) y 0.7-1 millones de muertes en niños menores de cinco años de edad, sobre todo en países en desarrollo y subdesarrollados².

Al menos 93 diferentes serotipos de *Sp* han sido identificados basados el polisacárido capsular (PsC), su principal factor de virulencia y contra los cuales ha ido dirigido el desarrollo de vacunas. Existen dos tipos de vacunas antineumocócicas licenciadas y aprobadas para su uso en humanos, todas empleando el PsC como principal antígeno. Por un lado tenemos las vacunas polisacáridicas planas (VPP) y por otro las vacunas polisacáridicas conjugadas (VPC), y el empleo de uno u otra dependen sobre todo de la edad de la persona a inmunizar. (Tabla 1)^{3,4}. Otro número considerable de vacunas contra el *Sp* se encuentran en investigación-desarrollo o en fase uno-dos de ensayo clínico, como es el caso de la vacuna antineumocócica cubana Quimi-Vio.

Quimi-Vio es una vacuna polisacáridica heptavalente conjugada desarrollada en el Instituto Finlay de Vacunas y compuesta por los PsC de los siete serotipos de mayor incidencia y circulación en Cuba (1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23F), todos conjugados al Toxoide Tetánico (TT) como proteína portadora y adsorbidas en Fosfato de Aluminio (AlPO4)^{5,6}.

Las vacunas profilácticas como Quimi-Vio, a diferencia de otros medicamentos, son administradas generalmente a personas sanas, principalmente niños, en su primer año de vida. Es por eso que desde 1981, la Organización Mundial de la Salud estableció regulaciones que garanticen la efectividad, eficacia y seguridad de las vacunas, desde las etapas de investigación-desarrollo hasta la liberación final del producto^{7,8,9}. Estos controles incluyen (dentro de muchos otros), la identificación de los ingredientes activos presentes en las vacunas, como un requisito obligatorio para la liberación final del producto^{8,9}.

Varias son las técnicas empleadas para llevar a cabo los ensayos de identidad de vacunas, sin embargo, las técnicas inmunoenzimáticas como los ELISAs, *Dot* y *Western Blot*, han sido las más empleadas por ser técnicas sencillas, rápidas y de fácil realización e interpretación de los resultados^{7,8,9}. En el caso del ensayo de identidad de Quimi-Vio se necesitaría además técnicas altamente específicas que permitan identificar cada PsC (de los siete presentes) en la formulación multivalente.

En este sentido, los anticuerpos monoclonales (AcM) con sus propiedades excepcionales de alta sensibilidad y especificidad, se han convertido en una potente herramienta analítica, que ha permitido, en otras vacunas polisacáridicas multivalentes contra *Nesisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*, realizar la identidad y cuantificación de los PsC de forma altamente específica en la formulación vacunal^{10,11}.

Recientemente el Laboratorio de AcM del Instituto Finlay de Vacunas, obtuvo AcM contra cinco de los siete PsC de *Sp* presentes en Quimi-Vio (1, 5, 6B, 14, y 19F). La alta especificidad y elevada constante de afinidad de estos AcM obtenidos, sugiere su posible uso como herramienta analítica para la identidad de la vacuna Quimi-Vio.

El presente trabajo propone la realización del ensayo de identidad de la vacuna cubana Quimi-Vio por *Dot Blot* empleando los AcM contra los PsC 1, 5, 6B, 14, y 19F de *Sp* obtenidos en el Instituto Finlay de Vacunas.

Tipo de Vacuna	Edad de aplicación	Composición	PsC incluidas
Vacunas Polisacáridicas Conjugadas	Para niños menores de 2 años e infantiles de 2 a 6 años de edad	Neumovac (7-valencia, Pfizer)	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F conjugados a CRM197 la variante atenuada de la Toxina Esférica (TE)
		Prevnar II (13-valencia, Pfizer)	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F conjugados a CRM197
		Synflorix (10-valencia, GlaxoSmithKline)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugados a la proteína D (de <i>Haemophilus influenzae</i>) excepto 18C y 19F conjugados a TT y TE respectivamente
Vacunas Polisacáridicas	Adultos en riesgo de enfermedad (≥ 65 años)	Prevnar (23-valencia, Merck)	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15, 18, 17F, 19C, 19A, 19F, 20, 23F, 23F y 34F

Tabla 1. Vacunas antineumococicas licenciadas

MATERIALES y METODOS

Muestras:

Polisacáridos Capsulares (PsC) de *Sp* serotipos 1, 5, 6B, 14, y 19F. Lotes 15.01 obtenidos en la planta de desarrollo del Instituto Finlay de Vacunas, preparados todos a una concentración de 16 µg / mL en agua destilada. Anticuerpos Monoclonales (AcM) contra los PsC de *Sp* serotipos 1, 5, 6B, 14, y 19F, obtenidos en el Laboratorio de AcM del Instituto Finlay de Vacunas

Quimi-Vio: Vacuna polisacáridica conjugada heptavalente contra *Sp* serotipos 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23 F, lotes NEU.15.01, NEU.15.02 y NEU.16.02. Obtenida en condiciones GMP en la planta de producción del Instituto Finlay de Vacunas. Composición: 4.4 µg/mL de todos los PsC excepto 6B que se encuentra al doble.

Prevenar® 13V: Vacuna conjugada neumocócica 13 valente, de Pfizer, lote 926785.02. Composición: 4.4 µg/mL de todos los PsC excepto 6B que se encuentra al doble.

Para la realización del *Dot Blot*, se utilizó un equipo Minifold II S&S (Alemania) acoplado a bomba de vacío y se empleó membrana de nitrocelulosa (MNC) de 0,2 µm (Bio-Rad, EUA). Se realizaron dos *Dot Blot* con los siguientes objetivos: 1) seleccionar las concentraciones óptimas de PsC y AcM a emplear para la captura y la detección respectivamente; 2) realizar el ensayo de identidad de la vacuna heptavalente cubana Quimi-Vio.

Selección las concentraciones óptimas de PsC y AcM a emplear para la captura y la detección respectivamente:

Para la captura, se aplicaron en forma de curva desde 16 µg/mL hasta 0.125 µg/mL los diferentes PsC (1, 5, 6B, 14 y 19F) de *Sp*, con un volumen de aplicación de 100 µL/pozo. Cada curva de PsC se aplicó por triplicado, para ser enfrentadas a las diferentes concentraciones del AcM evaluadas. Luego de 1 minuto de vacío para garantizar el secado de la MNC, se extrajo del equipo y se procedió al proceso de bloqueo de los sitios activos remanentes con PBS-Leche Descremada (LD) al 0.5% e incubación de 30 min a 37°C. Pasado este tiempo y tras tres lavados de 5 min con PBS/Tween-20 al 0.05%, se recortó la MNC en tiras verticales (3 tiras por cada PsC) y cada tira fue incubada 1h a 37°C con 10 mL del AcM homólogo a diferentes concentraciones 2.5, 5 y 10 µg/mL en PBS. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min y se incubaron todas las tiras durante 1h a temperatura ambiente con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Amersham) a una dilución 1:4000. Transcurrida la hora y tras 3 lavados de 15 min cada uno, el revelado de la reacción se realizó empleando Tableta SIGMAFAST™ DAB durante 10 min. La reacción se detuvo realizando varios cambios de agua destilada. Se seleccionó como concentración óptima de captura de cada PsC y de detección de cada AcM, la menor concentración donde se visualizó señal.

Identidad de la vacuna heptavalente cubana Quimi-Vio:

El procedimiento empleado fue muy similar al descrito anteriormente, en este caso se emplearon un total de cinco tiras de MNC y en cada una se aplicaron 100 µL (equivalente a 0.44 µg/pozo) de las siguientes muestras: PsC de *Sp* serotipo 1, 5, 6B, 14, y 19F, tres lotes de Vacuna Quimi-Vio y un lote de Vacuna Prevenar 13V. Posterior al bloqueo de los sitios remanentes de la MNC y tras pasos de lavado, en igual condiciones al ya descrito, cada tira fue incubada durante 1 h a 37°C, con 10 mL de AcM anti PsC serotipos 1, 5, 6B, 14, y 19F, (uno por tira), preparados a una concentración de 2.5 µg/mL en PBS. El resto de los procedimientos fueron realizados de forma similar a la ya descrita. Estos ensayos de identidad fueron realizados por triplicado para confirmar los resultados obtenidos.

Captura y procesamiento de las imágenes:

Las imágenes de los *Dot Blot* fueron capturadas y procesadas utilizando un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, EUA) con software de cuantificación (Quantity One).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Existen dos medidas en Salud Pública que han tenido un extraordinario impacto en la salud de los ciudadanos del mundo a lo largo de los años: la potabilización del agua y la vacunación. Las vacunas constituyen una de las medidas sanitarias que mayor beneficio ha producido y sigue produciendo a la humanidad, previendo enfermedades que antes causaban grandes epidemias, muertes y secuelas. Por otro lado, las vacunas benefician no solo a las personas vacunadas sino también a las personas no vacunadas y susceptibles que viven en su entorno (inmunidad de grupo)^{12,13}.

Sin embargo, el desarrollo de una vacuna es un largo, complejo y costoso proceso donde alrededor del 70% del tiempo es dedicado a la caracterización y al control de la calidad (CC) de este producto. La caracterización y el CC de las vacunas es más difícil que la de otros productos farmacéuticos, debido a la compleja estructura molecular de los antígenos que contienen, sus procesos de producción, y su interacción con agentes utilizados durante la fabricación o presentes en el lote final, tales como conservantes y adyuvantes^{14,15}.

En el pasado, el CC de las vacunas dependía principalmente de métodos para asegurar que los productos fueran seguros y potentes. Hoy en día se exigen otros requisitos adicionales como identidad, estabilidad, pureza, estructura del antígeno y consistencia en la producción, para obtener la aprobación regulatoria¹⁶.

Así el Ensayo de Identidad (EI) se establece por la Organización Mundial de la salud (OMS) y las autoridades Regulatorias Nacionales (en Cuba el CECMED) como un requisito obligatorio para toda liberación final de una vacuna. Entiéndase como EI un conjunto de métodos destinados a identificar en una formulación, el o los principios activos presentes y declarados en las especificaciones del producto. El EI se le realiza no solo a la vacuna final, sino también a los productos de partidas (materias primas) o a los Ingredientes farmacéuticos Activos (IFAs), que participan en el proceso de desarrollo de una vacuna. Deben ser en lo posible rápidos, sencillos, sensibles y sobre todo, específicos. Generalmente son métodos cualitativos más que cuantitativos^{16,17}.

En el caso de la vacuna cubana contra el *Sp*, Quimi-Vio, el EI tiene como objetivo identificar (cualitativamente) en el contexto de la formulación multivalente final, con una alta especificidad los siete PsC presentes en la misma. En este trabajo se presenta el *Dot Blot* como método para llevar a cabo el EI de esta vacuna, empleando los AcM contra cinco de los siete PsC presentes en la vacuna (1, 5, 6B, 14, y 19F), por ser los que hemos podido obtener en nuestro laboratorio.

Selección las concentraciones óptimas de PsC y AcM a emplear en el *Dot Blot* para la captura y la detección respectivamente:

En los ensayos inmunoenzimáticos como el *Dot Blot*, donde hay una etapa de inmovilización o captura de una biomolécula, determinar la concentración óptima de la misma a inmovilizar (en este caso el PsC) es un factor de suma importancia. Igualmente lo es la selección de las concentraciones óptimas de la molécula reactante (el AcM en este caso). Estos parámetros influyen en la formación de los complejos Ag-Ac, donde las concentraciones de ambas moléculas tienen que estar en el rango de la zona de equivalencia¹⁸.

Por esto como primer paso antes de realizar el Ensayo de Identidad de la vacuna, se realizó un análisis de las concentraciones de los PsC y de los AcM a emplear para que exista reconocimiento (señal). Figura 1.

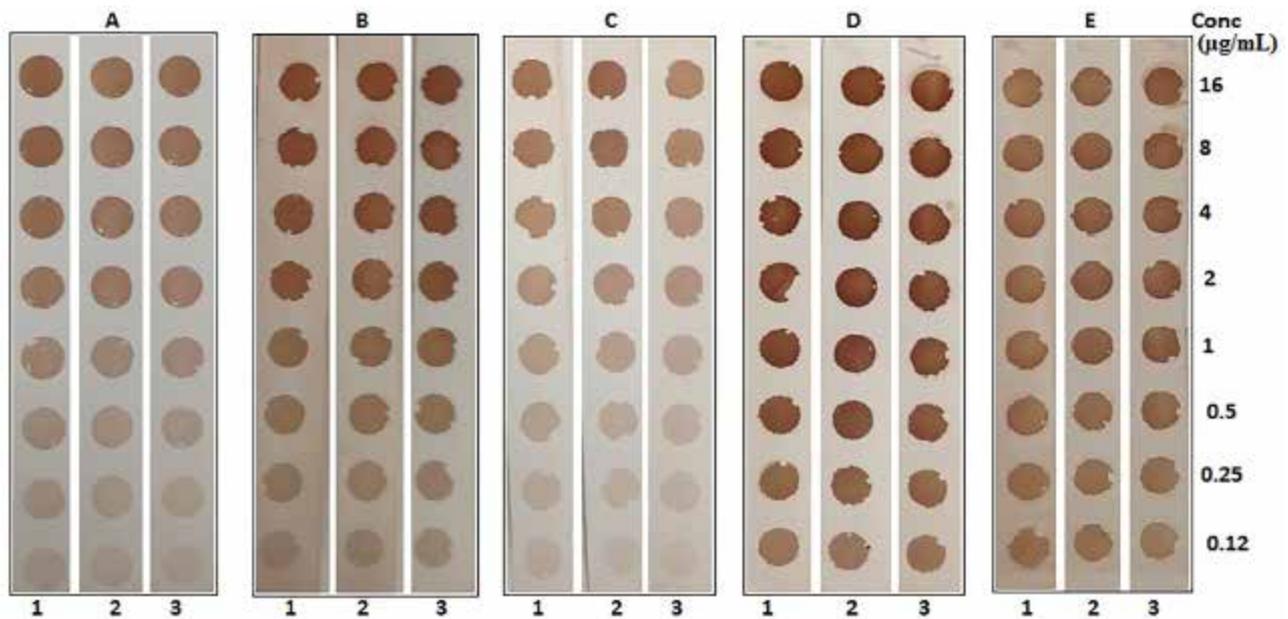


Figura 1. Determinación de la concentración óptima de los PsC y de los AcM para el Dot Blot. Los PsC de Sp (A:PsC-1, B:PsC-5, C:PsC-6B, D:PsC-14 y E:PsC-19F) se aplicaron en forma de curva desde 16 µg/mL hasta 0.125 µg/mL, por triplicado para cada una ser enfrentadas a diferentes concentraciones del AcM homologa (1:2.5 µg/mL, 2:5 µg/mL y 3:10 µg/mL). Las imágenes fueron capturadas y procesadas utilizando un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, EUA) con software de cuantificación (Quantity One).

En la Figura 1 se puede observar la presencia de manchas oscuras o señal (reconocimiento del PsC por su respectivo AcM) para todas las concentraciones de captura de los PsC evaluados y para todas las concentraciones de detección de los AcM empleados, llegando a observarse señal hasta la concentración mínima de PsC aplicada (120 ng/mL) para todas las concentraciones de AcM empleada. Para los PsC del serotipo 1(A), 5(B) y 6B (C) de Sp, existe una relación dosis-respuesta, pues a medida que disminuye la concentración de PsC inmovilizado, disminuye también la intensidad de la señal. Sin embargo, para los PsC de los serotipos 14 (D) y 19 F (E), este comportamiento no se observa. En la Fig 1 también se puede observar que en ninguno de los casos se observa una variación de la señal con el incremento en la

concentración del reactante (AcM). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el laboratorio durante el proceso de caracterización de los AcM y están relacionados con la alta sensibilidad y afinidad de estos AcM, siendo los AcM de mayor sensibilidad y afinidad los de 14 y 19F, lo que explica en el *Dot Blot* por qué no se ve una caída en la señal al disminuir la concentración de PsC ni de AcM, porque estamos en presencia de la zona de saturación o meseta de la reacción como se observa también en el ELISA. (Figura 2)

Este paso es llamado por muchos autores como estandarización del método y es muy importante. Primero porque las elevadas concentraciones del material de captura pueden provocar alteraciones en la sensibilidad y en el límite de detección del ensayo (efecto

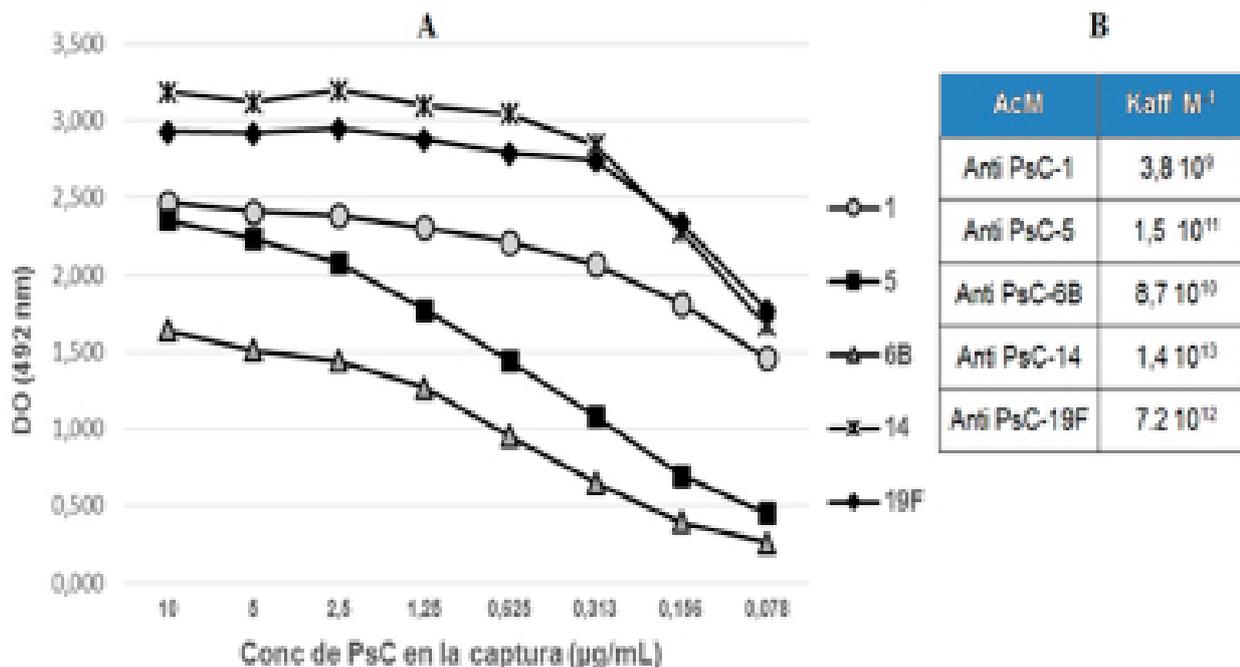


Figura 2. Sensibilidad y Afinidad de los AcM anti PsC serotipos 1,5, 6B, 14 y 19F de Sp. A) ELISA indirecto donde se recubre con concentraciones decrecientes de los diferentes PsC y los AcM se emplearon a una concentración de 10 µg/mL. B) Kaff: Constante de afinidad de los AcM.

“gancho”) por la formación de sobrecapas de biomoléculas débilmente adsorbidas, que se liberan fácilmente en los pasos siguientes, inhibiendo los inmunorreactantes en la fase líquida⁹. Por otro lado si tenemos en cuenta que la vacuna Quimi-Vio tiene una concentración por PsC de 4.4 µg/mL, significa que al aplicar 100 µL/pozo (volumen de trabajo sugerido) para la captura estaríamos aplicando 0.44 µg/porzo, cantidad en la que es necesario conocer de ante mano si existe reconocimiento, sobre todo porque es una concentración inferior a lo que se reporta como suficiente para que exista reconocimiento (1-10 µg/mL)⁹. Como se puede observar en la Fig 1 si existe reconocimiento a esta concentración e incluso a menos, lo que permitiría poder hacer diluciones de hasta 1:2 y 1:3 de la vacuna para el EI, permitiendo así el ahorro de muestra en el ensayo.

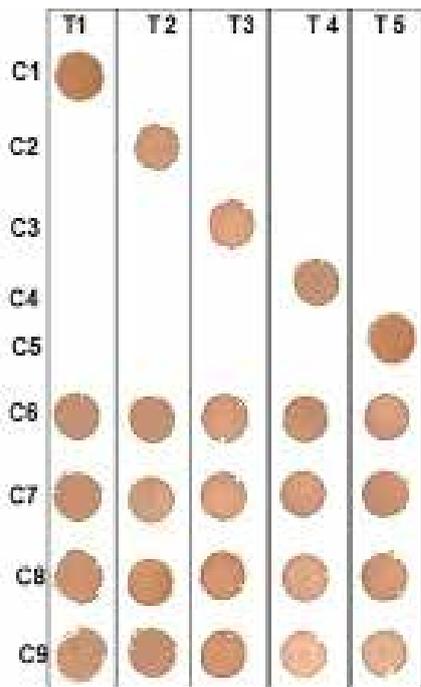


Figura 3. Identidad de la Vacuna Quimi-Vio mediante la técnica Dot Blot. Se emplearon cinco tiras (T) de MNC 0.2 µm y en cada una se aplicaron 100 µL de las siguientes muestras: Carril (C) del 1 al 5, PsC de *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 5, 6B, 14, y 19F en ese mismo orden, C6, 7 y 8: Vacuna Quimi-Vio lotes NEU.13.02, NEU.15.01 y NEU.15.02 respectivamente y en C8 Vacuna Prevenar 13V. Cada tira fue enfrentada a uno de los cinco AcMs anti PsC serotipos 1(T1), 5 (T2), 6B (T3), 14 (T4) y 19F (T5). Como segundo anticuerpo se empleó Anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa, dilución 1: 3000. Las imágenes fueron capturadas empleando un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, USA).

Identidad de la vacuna heptavalente cubana Quimi-Vio:

Varios han sido los métodos empleados para llevar a cabo la Identidad de las vacunas: Resonancia magnética Nuclear, Cromatografía en Fase Reversa, 2D Electroforesis (Foco Isoeléctrico más SDS-PAGE), Espectrometría de Masa, Western y *Dot Blot* Automatizado capilarmente y Técnicas Inmunoenzimáticas^{9,18,19}. Si bien las primeras han revolucionado los EI desde el punto de vista tecnológico en comparación a las técnicas Inmunoenzimáticas como los ELISAs y los *Dot Blot*, tienen las desventajas de ser muy costosas, no al alcance de todos, necesitan de un personal altamente calificado para llevarse a cabo y en la mayoría de los casos lleva un tratamiento previo de la muestra. El *Dot Blot* sin embargo es una técnica muy sencilla, de factible realización y poco consumo de tiempo, así como de fácil interpretación de

los resultados^{9,18}. Si a esto le sumamos el empleo en el *Dot Blot* de AcMs de alta especificidad y afinidad, pues hacen de esta técnica una gran herramienta analítica.

Una vez conocida las concentraciones de captura y detección de los PsC y de los AcM respectivamente, se desarrolló el ensayo de identidad de la vacuna Quimi-Vio. (Figura 3)

Como se puede apreciar en la Figura 3, cada AcM es capaz de identificar de forma altamente específica al PsC homólogo (mismo serotipo), tanto en su forma no conjugada y monovalente (carriles del 1 al 5) como en el contexto de las vacunas Quimi-Vio y Prevenar 13V, donde además de estar conjugado al TT se encuentra mezclado con otros PsC de forma multivalente y adsorbidos en fosfato de Aluminio. Dicho reconocimiento se evidencia por la presencia de manchas oscuras (señal) solamente en el pozo donde se encuentra inmovilizado el PsC homólogo. Sin embargo en el resto de los pozos donde se encuentran los otros PsC no se observa señal, no evidenciándose reactividad cruzada. Por ejemplo, la tira 1 (T1) fue enfrentada al AcM anti PsC serotipo 1 de Sp y solamente se observa señal en los carriles donde se aplicó el PsC 1 y los tres lotes de QuimiVio y Prevenar 13V, no observándose señal en los carriles donde se aplicó los otros PsC (5, 6B, 14 y 19F).

Estos resultados no solo demuestran la alta especificidad y no reactividad cruzada de los AcM empleados, sino también que la técnica *Dot Blot* puede ser empleada para el EI de la vacuna Quimi-Vio.

En el año 2010, los AcM cumplieron 30 años desde su invención, por lo que si bien su obtención no constituye una novedad por estos días, en nuestro caso, el ser propietarios de los hibridomas productores de todos estos AcM, únicos en nuestro país, representa una ventaja indudable, sobre todo si tenemos en cuenta que mediante su aplicabilidad se estaría garantizando el EI de una vacuna como Quimi-Vio que aún se encuentra en ensayo clínico, pero que ya desde estas etapas se está asegurando un requisito indispensable para la liberación final de los lotes, garantizando a su vez parte de su seguridad. Por otro lado, su uso no estaría condicionado a la compra en el mercado de reactivos que así lo garantice por lo que podría resultar más económica la implementación de su uso para esta prueba en la liberación de los lotes de vacunas.

Conclusiones

Los ensayos de identidad de las vacunas constituyen un aspecto importante para la liberación de lotes y control de la calidad de las mismas. Garantizar los reactivos necesarios para su realización tanto en cantidad como en calidad también es un aspecto necesario. Contar con una batería de AcM (única en el país) con una alta especificidad, reproducibilidad y de producción institucional, es un gran logro. Estos AcM además pueden ser usados con otros fines que no sean solo el de ensayos de identidad.

Referencias bibliográficas

1. Skinner JM, Indrawati L, Cannon J y col. Pre-clinical evaluation of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. *Vaccine*. 2011. Nov 8;29(48):8870-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.078.
2. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JPy col. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009. Sep 12;374(9693):893-902. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61204-6.

3. Fedson DS, Nicolas-Spony L, Klemets P y col. Pneumococcal polysaccharide vaccination for adults: new perspectives for Europe. *Expert Rev Vaccines*. 2011. Aug;10(8):1143-67. doi: 10.1586/erv.11.99.
4. Simell B, Auranen K, Käyhty H y col. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines*. 2012. Jul;11(7):841-55. doi: 10.1586/erv.12.53
5. Toraño GT, Llanes R, Pías LM, y col. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en Cuba y progresión de la resistencia a la penicilina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2010;62(2):157-60. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000200012
6. Toraño GT, Pías LM, Abreu M, y col. Serotipos y resistencia antimicrobiana de aislamientos meningeos de *Streptococcus pneumoniae*. Cuba, 2007-2012. *VacMonitor* 2014;23(3):117-123. www.finlay.sld.cu/vacmonitor.html
7. WHO. WHO vaccine position papers: World Health Organization. Available from: http://www.who.int/immunization/policy/position_papers/en/.
8. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations to Assure the Quality, Safety, and Efficacy of Pneumococcal Conjugate Vaccines. WHO Technical Report Series, No. 977, 2013, Annex 3. http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_977_Annex_3.pdf
9. Metz B, van den Dobbelen G, van Els C y col. Quality-control issues and approaches in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2009. Feb;8(2):227-38. doi: 10.1586/14760584.8.2.227
10. Reyes F, Amin N, Otero O, y col. Four monoclonal antibodies against capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, Y and W135: its application in identity tests. *Biologicals*. 2013. July;41(4):275-278. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.05.002>
11. Reyes F, Otero O, Cuello M, y col. Development of four sandwich ELISAs for quantitation of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W and Y in multivalent vaccines. *J Immunol Methods*. 2014. May;407:58-62. doi: 10.1016/j.jim.2014.03.020. Epub 2014 Apr 12.
12. Greenwood B. The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014. May 12;369(1645):20130433. doi: 10.1098/rstb.2013.0433.
13. Bustreo F, Okwo-Bele JM, Kamara L. World Health Organization perspectives on the contribution of the Global Alliance for Vaccines and Immunization on reducing child mortality. *Arch Dis Child*. 2015. 100(Suppl 1):s34-s37. doi:10.1136/archdischild-2013-305693
14. WHO. Weekly epidemiological record. Pneumococcal vaccines WHO position paper. 2012. No. 14:87.129-144. <http://www.who.int/wer>
15. US.PHARMACOPEIA. USP Guideline for Submitting Requests for Revision to USP-NF. Vaccines. 2007. April V3.1. http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/chapter4.pdf
16. WHO. Vaccine and immunization quality and safety. Web page http://www.who.int/immunization/quality_safety/en/
17. Hendriksen C, Arciniega JL, Bruckner L, y col. The consistency approach for the quality control of vaccines. *Biologicals*. 2008;36:73-77. doi:10.1016/j.biologicals.2007.05.002
18. Ochoa RF. Técnicas inmunoenzimáticas en el desarrollo clínico de vacunas. La Habana: Finlay Ediciones; 2013
19. Hamm M, Ha Sha and Rustand R. Automated capillary Western Dot Blot method for the identity of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Anal. Biochem*. 2015. June;478:33-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.021>
20. Abeygunawardana C, Williams TC, Sumner JS, y col. Development and validation of an NMR-based identity assay for bacterial polysaccharide. *Anal Biochem*. 2000. Mar 15;279(2):226-40. doi: 10.1006/abio.1999.4470

Recibido: diciembre 2016

Aprobado: febrero 2017

OMICS 2017

VARADERO, CUBA Oct 28 - Oct 31



The CIGB's Direction of Biomedical Research invites you to attend the VII International Meeting on **Bioinformatics and OMICS: "OMICS 2017"**

The Meeting will cover topics such as Bioinformatics and statistical methods for genomic and proteomic research, Technologies for OMICS data generation

During the meeting, also will be held the workshop: **"OMICS & Structural Biology of viral infections: tightening the control of re-emerging infectious diseases"**, with special emphasis in Dengue, Zika and Chikungunya viruses

Registration Fee and Information:

Regular Registration Fee

Category	Registration Fee
Student (*)	\$ 350 CUC
Academic	\$ 450 CUC
Business	\$ 500 CUC
Accompanying Person (**)	\$ 100 CUC

Early Registration Fee

(deadline August 18th, 2017)

Category	Registration Fee
Student (*)	\$ 300 CUC
Academic	\$ 350 CUC
Business	\$ 400 CUC
Accompanying Person (**)	\$ 100 CUC

Meeting Venue **Melia Marina Varadero Hotel**



Download the Melia Marina Varadero hotel Datasheet from:

<http://biomed.cigb.edu.cu/assets/Hotels/Fact%20Sheet%20M%20MV.pdf>

To book your accommodation with Havanatur please contact:

Lic. Alexander Socorro
 Department of Scientific Events and Meetings
 email: alexander@havanatur.cu
biomed@cigb.edu.cu

