

Sensibilización de placas para ensayos inmunoenzimáticos con antígenos vacunales

Rolando Ochoa, Juan Carlos Martínez, Xenia Ferriol, Ana Margarita García, Eric Estrada, Rosa Blanco, Tania Licea, Franklin Sotolongo.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: ochoa@finlay.edu.cu

Se describe un procedimiento de sensibilización de placas para ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) con antígenos vacunales. Se define como concentración óptima de sensibilización aquella donde se alcanza la mayor densidad óptica con los sueros estándares y la menor con los sueros negativos y el blanco reactivo. Como modelo se emplean ensayos indirectos correspondientes a los antígenos de captura: toxoide tetánico, diftérico y la vesícula de membrana externa de meningococo B, materia prima activa de la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC®. Esta metodología permite alcanzar un mayor recubrimiento de la fase sólida, lo cual incrementa la sensibilidad de los ensayos. La ocupación de espacios libres en la placa se hizo más evidente con antígenos de menor peso molecular, como los toxoides diftérico y tetánico.

Palabras claves: ELISA, antígeno, vacuna, sensibilización.

Introducción

En los ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA) es muy importante el paso de sensibilización de esta fase. En estos ensayos hay una proporcionalidad entre el número de moléculas inmovilizadas en la primera capa sobre la matriz sólida y las que reaccionan en la segunda capa; esta proporcionalidad continúa en capas posteriores y es responsable de la sensibilidad del ensayo. El fondo desempeña un papel importante, afectando la detectabilidad, porque con una señal de fondo elevada (absorbancia) se hace más difícil discriminar bajas concentraciones del analito en la muestra. El número de moléculas adsorbidas en la primera capa es aproximadamente de 100 ng/cm² en poliestirenos normales; cuando se usan superficies de alta captación este número puede incrementarse acerca de 400 ng/cm². Para obtener la máxima sensibilidad del ensayo, la adsorción de biomoléculas debe ser tal que sature hasta cierto punto la superficie del soporte y disminuya también el valor de la señal de fondo al máximo posible, mediante el llenado de los espacios libres sobre la superficie, que facilitan las uniones inespecíficas (1-9).

Para determinar la concentración o actividad óptima de recubrimiento se aplicó una metodología optimizada en nuestro laboratorio, que usa no sólo sueros estándares positivos, sino también sueros negativos y el blanco reactivo.

Materiales y Métodos

Antígenos

Como antígenos de captura, se evaluaron las vesículas proteicas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (PM>1x10⁶ Da), toxoide tetánico (PM=150000 Da) y toxoide diftérico (PM=62000 Da) (10-12).

Muestras empleadas

Los sueros humanos estándares respectivos, los sueros negativos y el blanco reactivo; solución amortiguadora fosfato salino 0,15 M pH 7,2 (AFS), que contenían un 0,05% (v/v) de Tween 20 (AFST) y con 3% (p/v) de leche descremada (AFSTL).

Sensibilización de placas para ELISA

Se sensibilizaron placas de poliestireno de alta captación (Costar 3590, USA) con diferentes concentraciones de antígenos en solución amortiguadora carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9.6, incubando 16-20 h entre 2-8 °C.

Procedimiento ELISA

Una vez eliminado el exceso de antígenos mediante cuatro lavados con AFST, se realizaron los posteriores pasos de los ELISA indirectos desarrollados para la cuantificación de anticuerpos contra los anteriores antígenos (13-15).

Los sueros se diluyeron en AFSTL. La dilución fue 1:20 para antitoxinas tetánica y diftérica y 1:200 para anti

proteína vacunal de VA-MENGOC-BC[®], teniendo en cuenta en cada caso el nivel de detección de cada ensayo (13-15).

Como conjugado se usó anti IgG humana-Fosfatasa Alcalina (A0287 Sigma, USA) diluido 1:2000 en AFSTL.

Las incubaciones fueron de 1 h a 37 °C y los lavados entre cada paso se hicieron con AFST (4 lavados de 30 segundos cada uno). Después de incubar 30 min con el sustrato p-nitrofenil fosfato (Sigma 104[®], USA) la absorbancia se midió a 405 nm en un lector de ELISA (Anthos 2001, Labtec Instruments, Austria).

Análisis Estadístico

El procedimiento de sensibilización se evaluó empleando las muestras descritas anteriormente, realizándose por cada punto 4 réplicas en tres ensayos diferentes. Con los valores promedios de absorbancia obtenidos con los sueros humanos estándares, los sueros negativos y el

blanco reactivo, se construyeron gráficos de dispersión para cada antígeno con puntos de datos conectados por líneas suavizadas (16).

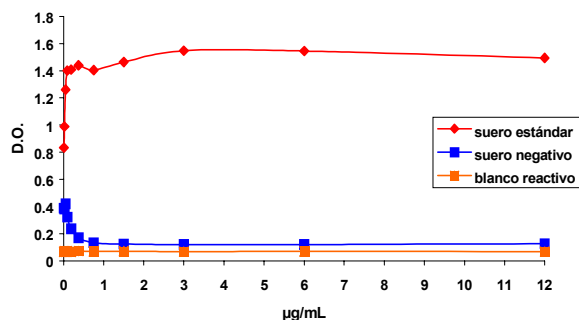
Se definió como concentración óptima de recubrimiento aquella con la que se alcanzó la meseta de mayor señal con los sueros estándares y la menor para los sueros negativos y el blanco reactivo, resultado que debe repetirse en una serie de diferentes concentraciones cercanas, no debiendo encontrarse variaciones significativas dentro y entre los grupos la prueba de análisis de varianza (17), previa determinación de la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (17). Se consideró un error de primer tipo $\alpha = 0,05$.

Resultados y Discusión

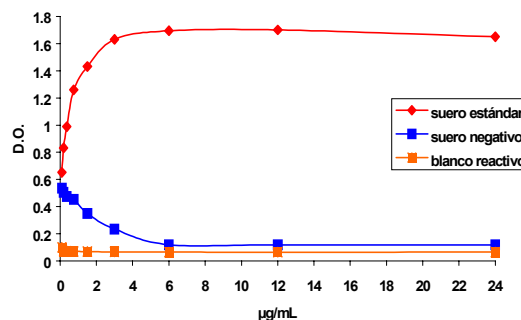
Se verificó la etapa de sensibilización de las placas de poliestireno para ELISA, para lo cual se analizó la relación entre la densidad óptica alcanzada con los sueros empleados y el blanco reactivo. (Figura 1 a-c).

Figura 1. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento para diferentes antígenos vacunales.

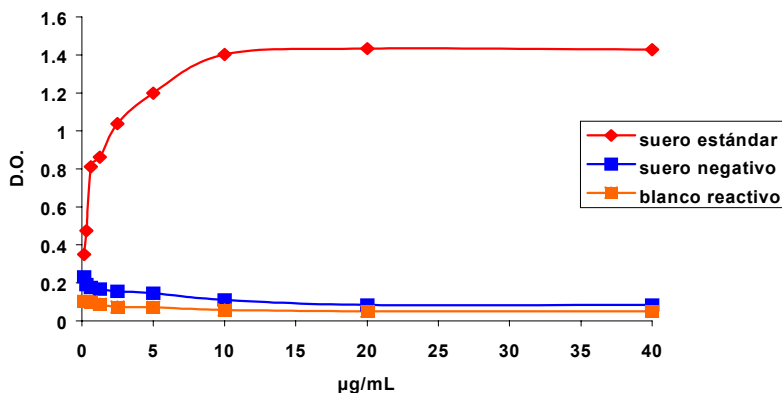
a) Toxoide tetánico



b) Toxoide diftérico



c) Vesículas proteicas de membrana externa



En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de recubrimiento que se seleccionaron en estos casos, teniendo en cuenta los principios definidos, o sea, con las que se alcanza la meseta de mayor señal con los sueros estándares y la menor para los negativos y el blanco reactivo, no detectándose diferencias con respecto a las concentraciones ubicadas en dicha zona ($p > 0,05$).

Tabla 1. Concentración óptima de recubrimiento con antígenos vacunales

Antígeno de recubrimiento	Concentración óptima
Toxoide tetánico	6 µg/mL (10 Lf/mL)
Toxoide diftérico	3 µg/mL (8 Lf/mL)
Vesículas de membrana externa de meningococo B	20 µg/mL

La adsorción de biomoléculas depende de varios factores que pueden resumirse en los inherentes a las condiciones de reacción (incluyendo la fase sólida) y las características físico químicas de las moléculas (1-9). Según el predominio de grupos hidrofóbicos o hidrofílicos se facilitará la unión a placas con esas características (1-9). En nuestro caso se usaron placas Costar 3590 de alta captación, que facilita la adsorción de biomoléculas hidrofílicas, por lo que resulta apropiado para los antígenos proteicos estudiados. Otra característica importante es la talla del antígeno, que se relaciona de forma inversa con la adsorción (1, 2, 7, 8, 9).

La determinación de la concentración óptima de sensibilización se hace habitualmente midiendo la actividad de anticuerpos de un suero positivo a diferentes concentraciones de recubrimiento, hasta lograr el máximo de respuesta, de modo que ésta se repita en una serie de diferentes concentraciones cercanas entre sí, conocida como zona de meseta (2, 6, 7, 8, 9). Sin embargo, este procedimiento no tiene en cuenta las interferencias estéricas entre las inmunoglobulinas unidas a los antígenos de captura (1, 2, 6, 7, 8) por lo que puede alcanzarse una alta señal sin una real saturación de la fase sólida, en estas circunstancias, los espacios libres tienen que ser bloqueados con partículas inertes (1-8).

Nuestra metodología permite alcanzar un mayor recubrimiento de antígeno sobre la superficie del poliestireno, garantizando la sensibilidad y detectabilidad de este tipo de ensayo, dado por el empleo de sueros estándares, tal y como se describió, y el uso además del blanco reactivo y sueros negativos, que contribuyen a seleccionar la concentración de antígeno de

recubrimiento adecuada. Con estos últimos sueros se evaluó la disminución de las uniones inespecíficas, reflejada en una disminución de la absorbancia de fondo, usando las propias biomoléculas para llenar los posibles espacios libres.

Se observó como la ocupación de estos espacios se hizo más evidente en las moléculas más pequeñas (Figura 1 a-b) (10, 11), a pesar de la menor dilución de los sueros (1:20) empleada para las antitoxinas tetánica y diftérica, teniendo en cuenta la detectabilidad requerida en estos ensayos (13, 15), lo que pudiera facilitar la unión inespecífica de inmunoglobulinas con el poliestireno. La disminución del valor de absorbancia obtenido con los sueros negativos, y por tanto señal inespecífica, es dependiente de la cantidad de toxoide empleado en la sensibilización de las placas, observándose claramente la declinación de esta respuesta, lo que es menos evidente con moléculas de elevada talla (Figura 1 c). Probablemente la mayor dilución del suero (1:200) usada en el ELISA de proteína vacunal de VA-MENGOC-BC®, haya contribuido a disminuir las señales inespecíficas, por lo que de requerirse una menor dilución, no puede descartarse la necesidad de un paso de bloqueo convencional con proteínas inertes a continuación de la fase de sensibilización.

La metodología para la sensibilización de placas para ELISA que se ha optimizado puede ser muy útil para el desarrollo de estas técnicas en ensayos preclínicos y clínicos de vacunas.

Referencias

- Esser P. Principles in adsorption to polystyrene. *Nunc Bulletin*. 1988; 11(6):1-5.
- Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R *et al*. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor*. 2000; 9(3):13-18.
- Esser P. Blocking Agent and Detergent in ELISA. *Nunc Bulletin*. 1991; 6(9):1-4.
- Péterfi Z, Kocsis B. Comparison of blocking agents for an ELISA for LPS. *Journal of Immunoassay*. 2000; 21:341-354.
- Steinitz M. Quantitation of the blocking effect of tween 20 and Bovine Serum Albumin in ELISA microwells. *Analytical Biochemistry*. 2000; 282:232-238.
- Steinitz M, Baraz L. A rapid method for estimating the binding of ligands to ELISA microwells. *Journal of Immunological Methods*. 2000; 238:143-150.
- Tijssen P. The immobilization of immunoreactants on solid phases. En: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and theory of enzyme immunoassays*, Amsterdam, London, New York, Tokyo, *Elsevier*. 1993:297-328.

8. Labsystems. Studies on Immobilization of Biological Materials. Enhanced Adsorption to Modified Polystyrene. Labsystems Research Centre, Finland, 1998.
9. Tijssen P. Kinetics and nature of antibody-antigen interactions. En: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and theory of enzyme immunoassays, Amsterdam, London, New York, Tokyo, Elsevier, 1993:123-149.
10. Galazka AM. The Immunological Basis for Immunization Series. Module 2. Diphtheria. World Health Organization: Geneva, 1996.
11. Galazka AM. The Immunological Basis for Immunization Series. Module 3. Tetanus. World Health Organization: Geneva; 1996.
12. Poolman JT, Van der Ley PA, Tommassen J. Surface structures and secreted products of meningococci. In: Cartwright K editor. *Meningococcal Disease*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England, 1995:21-34.
13. Martínez JC, Ochoa R, Cruces A, Fajardo EM, Alvarez E, Ferriol X, *et al.* Validation of an ELISA for the Quantitation of Diphtheria Antitoxin in Human Serum. *Biotechnología Aplicada*. 2000; 17:183-186.
14. Ferriol X, García AM, Ochoa R, Bravo I, Blanco R, Estrada E, *et al.* Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG humana anti proteína de la *Neisseria meningitidis* serogrupo B. *Rev Cubana Med Trop*. 1999;51(2):99-105.
15. Ochoa R, Martínez JC, Fajardo E, 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.
16. Microsoft® Excel 2000 [computer program]. Microsoft Corporation. USA, 2000.
17. Statgraphics® plus for Windows™ [computer program]. Versión 3.1. Statistical Graphic Corp. USA, 1998.

Coating of ELISA plates with vaccine antigens

Abstract

A procedure for coating ELISA plates with vaccine antigens is described. The optimum coating concentration was that achieving the highest absorbance for the standard sera and the lowest for the negative controls and the reagent blank. Indirect ELISA is used as model. Tetanus and diphtheria toxoids, and meningococcal B outer membrane vesicle, active principle of the meningococcal vaccine VA-MENGOC-BC®, were used as capture antigens. That procedure increases sensitivity of the assays due to coating optimization. The saturation of possible free spaces was more evident with the lowest molecular weight antigens, such as diphtheria and tetanus toxoids.

Keywords: ELISA, antigen, vaccine, plate coating.