

Validación de un ensayo ELISA para la determinación de anticuerpos anti LPS de *Vibrio Cholerae*

Yadira Pino, Tania Valmaseda, Yudisey Medina, Bárbara Cedré, Gemma Año, Hilda M. García, José Luis Pérez, Arturo Talavera, Irma González, Ileana Delgado y Luis García

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.
E-mail: ypino@finlay.edu.cu

Para evaluar la respuesta inmunológica de cualquier candidato vacunal es necesario contar en el laboratorio con técnicas estandarizadas y validadas. Es por ello que en este trabajo se realizaron los ensayos para la estandarización del ELISA indirecto, usado para la determinación de anticuerpos séricos anti-LPS Ogawa contra cólera en suero de humanos inoculados por vía oral, así como la evaluación de los parámetros de validación típicos de este ensayo. Para la selección de las condiciones óptimas se evaluaron la concentración de recubrimiento, condiciones de bloqueo y dilución de conjugado, con el objetivo de seleccionar las mejores respuestas para el control positivo, el control negativo y el blanco en cada caso. Una concentración de 25 µg/mL de LPS Ogawa en PBS, como recubrimiento, durante toda la noche; leche descremada al 0,5% en PBS, 30 min a temperatura ambiente como bloqueo y el conjugado anti-IgA-HRP diluido 1:5000, resultaron las variables óptimas para el ensayo. En cuanto a la validación de la técnica los parámetros evaluados fueron precisión, exactitud, límite de detección, especificidad y robustez. Para ello se siguió un protocolo de validación que permitiera evaluarlos, y en todos los casos el ensayo se consideró adecuado, siempre y cuando el coeficiente de variación resultara ser menor del 20%. En todos los parámetros evaluados se cumplió con este requisito, considerando así los resultados confiables y reproducibles.

Palabras claves: Cólera, ELISA, estandarización, validación.

Introducción

El desarrollo de la inmunología, específicamente el estudio de la inmunidad de mucosa y el hecho de que el agente etiológico del cólera no es un germen invasivo, ha llevado a la aceptación general de que una vacuna contra el cólera, verdaderamente protectora, debe ser administrada por vía oral, de manera que estimule adecuadamente al sistema inmune a nivel de la mucosa intestinal (1). En este sentido, en el Laboratorio de Bacterias Enteropatógenas del Instituto Finlay se trabaja intensamente, desde hace varios años, con el propósito de lograr una vacuna contra esta enfermedad.

La cepa 638 *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa es uno de los candidatos vacunales que ha sido evaluado en humanos y ha resultado ser bien inmunogénica y poco reactogénica (2). Las técnicas más empleadas en los estudios preclínicos y clínicos para la evaluación de la inmunogenicidad son el ensayo de inmunoabsorción ligado al enzima (ELISA), utilizado para la determinación de anticuerpos séricos contra el

Lipopolisacárido (LPS) de *V. cholerae* (3) y la determinación de anticuerpos vibriocidas (4).

Debido a que la evaluación de la inmunogenicidad producida por una vacuna requiere de una adecuada consistencia y reproducibilidad en sus resultados, la correcta estandarización del ensayo analítico, seguida de la validación del método, son elementos que además de su importancia individual, están estrechamente relacionados.

En este trabajo se resumen los principales resultados en el proceso de estandarización y validación del ELISA utilizado para la determinación de anticuerpos de clase IgG, IgA e IgM en suero de humanos inoculados con la cepa atenuada 638 *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa, candidato vacunal contra cólera.

Materiales y Métodos

Muestras evaluadas: Se seleccionaron los sueros procedentes de voluntarios previamente inoculados por vía oral con la cepa atenuada 638 *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa, o que recibieron placebo, en los ensayos

controlados de evaluación de la reactogenicidad e inmunogenicidad en esta cepa.

Selección de las condiciones óptimas de ensayo

Se realizó la estandarización del ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos séricos anti-LPS, variando parámetros como concentración de recubrimiento, tipo y condiciones de bloqueo y diluciones del conjugado, con el fin de seleccionar en cada caso la mayor respuesta para el control positivo, los menores valores para el control negativo y el blanco. La lectura de la placa se realizó a 492 nm y el título se definió como el logaritmo del inverso de la dilución interpolada a la que se alcanza el valor de absorbancia de 0.4.

Parámetros de Validación

El ELISA se realizó según las condiciones óptimas alcanzadas en la estandarización y descritas en el Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) No:12-264.

- **Precisión**

Se estimó titulando tres muestras de suero de alto, medio y bajo título de anticuerpos IgA, IgG e IgM. Cada muestra se tituló siete veces. Se hicieron tres replicados para las pruebas intra e interensayos. Para expresar las variaciones se calculó el coeficiente de variación (CV). Como criterio de aceptación se usó un CV menor del 20% (5).

- **Exactitud**

Se evaluó una muestra de título conocido siete veces en una misma placa. Se le calculó el título de la muestra y el antilogaritmo para conocer la dilución de trabajo (6). Como criterio de aceptación se usó un CV menor del 20% (7, 8).

- **Límite de detección**

Se hicieron 72 repeticiones del blanco reactivo (suero negativo) en tres placas diferentes para cada una de las clases de anticuerpos evaluadas en este trabajo. Se tomó como estimado del límite de detección el valor promedio, más tres veces la desviación estándar.

- **Especificidad**

Se realizó el ensayo utilizando como muestra un suero humano de un voluntario vacunado con la vacuna cubana antileptospira vax-SPIRAL y una muestra de suero humano anticólera.

- **Robustez**

Para evaluar la robustez del método se introdujeron pequeñas variaciones en la técnica con el objetivo de determinar su influencia en los resultados.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico SPSS sobre Windows, versión 10.0, así como el paquete estadístico R, versión 1.4.1. Se usó un nivel de significación estadística del 0,05% para todas las comparaciones. Para el análisis de la especificidad y robustez se usó un test de ANOVA simple para comparar los títulos medios geométricos de las muestras para las tres inmunoglobulinas.

Resultados y Discusión

En la evaluación de la inmunogenicidad frente a candidatos vacunales contra cólera, constituyen herramientas muy valiosas los métodos ELISA para la determinación de anticuerpos séricos contra el LPS de *V. cholerae* (3) y la determinación de anticuerpos vibriocidas (4).

Para establecer las condiciones óptimas de ensayo analizamos diferentes concentraciones de LPS Ogawa, desde 1,25 µg/mL hasta 100 µg/mL en tampón PBS, pH 7.4 o en tampón Carbonato 50 mM, pH 9.6, a diferentes tiempos de incubación. Se comprobó que la concentración de LPS a 25 µg/mL en tampón PBS pH 7.4, mostró una señal más definida entre el suero positivo y negativo que en Carbonato 50 mM, pH 9.6, no existiendo diferencias significativas entre ambos amortiguadores ($p > 0,05$). En cuanto al tiempo resultó que 1 h para el recubrimiento de la placa con el LPS fue insuficiente, los tiempos de incubación de 2 h, 4 h y toda la noche no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$) y sí con el de 1 h ($p < 0,05$), por lo que se decidió realizar la sensibilización de la placa toda la noche para optimizar el tiempo de realización de la técnica.

En el bloqueo se evaluaron diferentes concentraciones de leche descremada a diferentes tiempos y temperaturas de incubación. Cuando obviámos el paso de bloqueo se observó un incremento de la señal tanto para el suero positivo como para el suero negativo; esto puede ser debido a reacciones inespecíficas. Al variar las concentraciones de leche descremada desde 0,5% hasta el 3% no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Tampoco se observaron diferencias significativas cuando variámos la temperatura a (37 °C y a temperatura ambiente) y los tiempos de incubación (30 min y 1 h) ($p > 0,05$).

Para establecer la dilución óptima de trabajo del conjugado anti-IgA humana se analizaron diluciones desde 1:1000 hasta 1:10000 a temperatura ambiente. También se variaron los tiempos de reacción del mismo. La selección de la dilución óptima del

conjugado se determinó discriminando la mayor diferencia de señal de absorbancia entre el suero control positivo y el negativo (9, 10). Se observó que las diluciones de conjugado 1:4000 y 1:5000 no mostraron diferencias significativas entre ellas ($p>0,05$) y sí entre estas y las diluciones superiores ($p<0,05$). Diluciones de conjugado por debajo y por encima de 1:4000 y 1:5000 no mostraron señales de absorbancia adecuadas para este tipo de ensayo, lo que pudo deberse a reacciones inespecíficas en el reconocimiento del complejo antígeno-anticuerpo por el conjugado. Por lo que, decidimos trabajar con 1:5000 para un uso eficiente de este reactivo que tiene un alto precio en el mercado internacional. Por otra parte, analizando la dilución escogida (1:5000) se demostró que no hay diferencias significativas entre los tiempos de incubación de 1 h y 2 h ($p>0,05$) y sí con respecto a 30 min ($p<0,05$). Es por ello que para desarrollar el ensayo en un menor tiempo, resultó más factible trabajar el conjugado a una dilución 1:5000, 1 h a temperatura ambiente.

En resumen, las condiciones óptimas de ensayo para la determinación de los anticuerpos de clase IgA en suero humano fueron: recubrimiento con LPS Ogawa a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón PBS, pH 7.4 e incubación toda la noche a 4 °C; bloqueo con leche descremada al 0,5% en PBS, pH 7.4 durante 30 min a temperatura ambiente; muestras y controles diluidas en tampón PBS, pH 7.4 -Tween 20 al 0,05%, incubando 2 h a temperatura ambiente; conjugado anti-IgA en dilución 1:5000 en leche descremada al 1% en el mismo tampón, 1 h a temperatura ambiente.

Validación del ELISA

La metodología seguida en la validación está descrita en el Protocolo de Validación 11-069.

Según las categorías que establece la OMS los métodos analíticos se agrupan en cuatro categorías y nuestro método está incluido en la clase D (potencia y actividad) debido a que el ELISA es una técnica *in vitro* donde se miden anticuerpos específicos contra cualquier tipo de antígeno, se requieren cantidades mínimas de suero y permite evaluar un gran número de muestras de ensayo (5).

• Precisión

Las tres muestras de sueros estudiadas en la precisión intraensayo, resultaron ser menores del 5% (Tabla 1). Solo en la determinación de anticuerpos IgM en el suero de bajo título el CV alcanzó valores superiores al 6% (6,29%). Estos resultados están dentro del límite aceptado por la OMS para técnicas de este tipo. En la precisión intermedia los CV estuvieron por debajo del 15% (Tabla 2). Solo para la determinación de IgG en el suero de título alto se alcanzó un CV superior al 15% (15,22%). Por lo que estos resultados los consideramos altamente satisfactorios según lo reportado para inmunoensayos (11). Se ha reportado que el CV para este parámetro no debe superar el 20%, siendo óptimos los inferiores al 5% y el 10% respectivamente (12). En este estudio las diferencias entre los CV de ambos ensayos puede deberse al grado de preparación técnica que tienen ambos analistas. No obstante, estos valores son considerados aceptables para reportar la precisión intermedia de este tipo de ensayo biológico. Se debe tener en cuenta que la precisión está limitada por errores accidentales en las condiciones experimentales como errores técnicos, manuales que en ocasiones no pueden ser evitados (13). Por lo que podemos afirmar que la ligera imprecisión encontrada no hace peligrar la reproducibilidad de los resultados.

Tabla 1. Coeficiente de variación de las muestras en el ensayo de repetibilidad.

Muestras n=7	IgA		IgG		IgM	
	Título promedio	CV (%)	Título promedio	CV (%)	Título promedio	CV (%)
Alta	2,35	1,14	2,83	1,21	2,75	3,54
Media	2,21	2,69	2,65	1,40	2,42	0,78
Baja	1,99	1,13	2,52	4,40	2,18	6,29

Título: es el \log_{10} del inverso de la dilución interpolada que dio una lectura de densidad óptica de 0,4 por encima del blanco de la placa.

Tabla 2. Coeficiente de variación de las muestras en el ensayo de precisión intermedia.

Muestras n= 7	IgA		IgG		IgM	
	Título promedio	CV (%)	Título promedio	CV (%)	Título promedio	CV (%)
Alta	2,35	1,10	1,10	15,22	1,02	7,42
Media	2,26	2,67	0,72	10,49	0,85	4,09
Baja	1,88	6,31	0,44	10,03	0,62	7,32

Exactitud

Para valorar la exactitud se determinó el título de anticuerpos de tipo IgA, IgG e IgM anti-LPS Ogawa a la muestra de suero positivo. Se calculó el antilogaritmo

del título de anticuerpos para determinar las diluciones del suero para IgA, IgG e IgM, las cuales fueron 1:600, 1:500 y 1:200 respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Coeficientes de variación para el ensayo de exactitud.

Clase de Inmunoglobulina	Dil. de trabajo	Título promedio	DE	CV (%)
IgA	1:600	2,78	0,04	13,48
IgG	1:500	2,70	0,03	10,60
IgM	1:200	2,34	0,02	13,06

DE: Desviación estándar

Los CV resultaron ser menores del 15% para las tres inmunoglobulinas evaluadas, lo que permite considerar que nuestro método es exacto y que por tanto mide la concentración real de anticuerpos específicos presentes en la muestra, dentro del error experimental. La exactitud depende de la reacción inmunoenzimática, de la muestra en estudio y la especificidad del método, por lo que podemos pensar que la estrategia seguida para el desarrollo de nuestro ensayo fue adecuada (14).

Límite de detección

Para la evaluación de este parámetro se realizaron 72 repeticiones del blanco reactivo (Tabla 4). Se observó que la absorbancia mínima detectable para cada una de las repeticiones de la muestra supuestamente negativa fue baja. El límite de detección calculado adicionándole al valor promedio de la absorbancia tres veces la desviación estándar (15) mostró que nuestro ensayo, a pesar de no ser cuantitativo sería capaz de detectar

cantidades mínimas de anticuerpos frente al antígeno de interés (LPS). El límite de detección calculado en nuestro estudio coincide con los reportados por diferentes autores para evaluar la respuesta inmune inducida por vacunas (14, 16). Sin embargo, no se puede descartar la presencia de cantidades mínimas de anticuerpos específicos no detectables por este método. En la literatura se plantea que para evaluar la inmunogenicidad en vacunas o para realizar estudios seroepidemiológicos, es conveniente utilizar ensayos cuantitativos, en los cuales los resultados presentan una distribución continua (14, 15). Este ensayo se trata de un ELISA semicuantitativo, en el cual los resultados se expresan en forma de títulos de anticuerpos (logaritmo del inverso de la dilución) los cuales constituyen valores discontinuos (14, 17). Es importante señalar que el proceso de sensibilización y recubrimiento de la fase sólida de la placa es imprescindible para obtener buenos resultados en este parámetro (18).

Tabla 4. Límite de detección para el inmunoensayo.

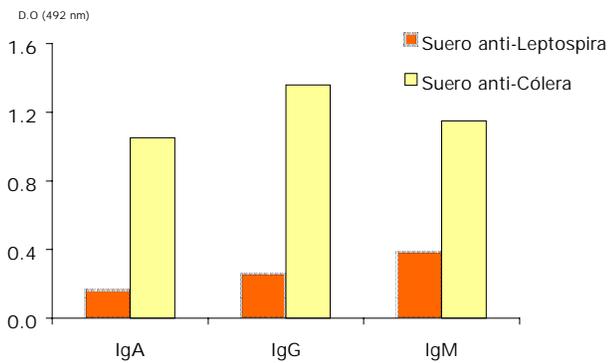
Clase de Inmunoglobulina	Abs. promedio (n= 72)	DE	Límite de detección
IgA	0,145	0,004	0,158
IgG	0,266	0,015	0,313
IgM	0,179	0,065	0,377

Abs. Absorbancia

• **Especificidad**

La especificidad se determinó evaluando un suero de humano inmunizado con la vacuna antileptospirosis cubana vax-SPIRAL y comparándolo con la muestra de suero positivo utilizada para la estandarización y validación del método. La muestra de suero anti-leptospira no mostró respuesta de anticuerpos para ninguna de las clases de inmunoglobulinas evaluadas frente al LPS Ogawa, existiendo diferencias significativas entre las dos muestras evaluadas ($p <$

Figura 1. Especificidad del inmunoensayo. Significación estadística entre ambas muestras ($p < 0,05$).

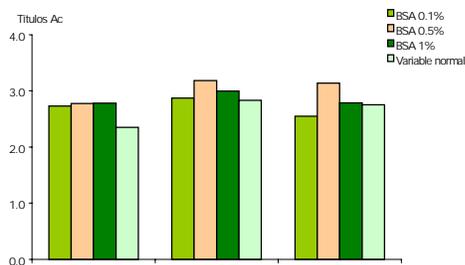


• **Robustez**

En este parámetro se realizaron pequeñas variaciones a la técnica para determinar la variabilidad en la medición de la respuesta de anticuerpos.

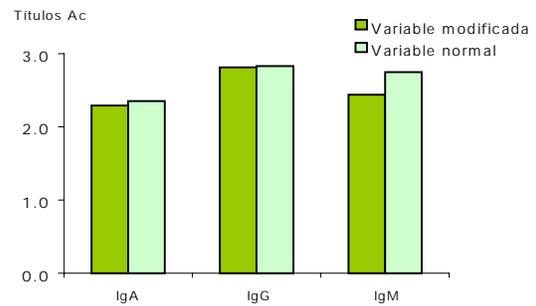
La primera variable que analizamos fue la incubación de la muestra de suero por 1 h a 37 °C. Como se observa en la Figura 2, no encontramos diferencias significativas entre la condición utilizada, normalmente usamos para la realización del ensayo (2 h a temperatura ambiente) ($p > 0,05$).

Figura 3. Robustez variando bloqueo y conjugado en BSA. Variable normal: bloqueo con leche descremada 0,5% y conjugado en leche descremada al 1%.



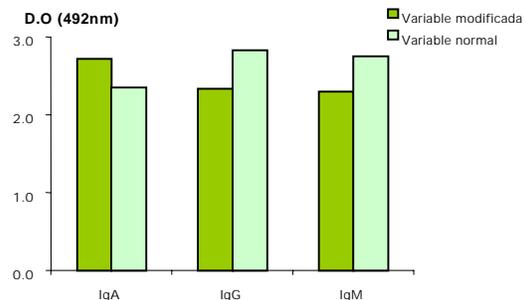
0,05), por lo que podemos considerar que este método de ensayo es específico. Además, podemos plantear que debido a la pureza del antígeno utilizado para el recubrimiento de la placa se pudo discriminar entre anticuerpos específicos y no específicos sin la interferencia de otros componentes séricos no relacionados, de ahí la alta especificidad alcanzada en el ensayo.

Figura 2. Robustez. Evaluación de la incubación de la muestra de suero positivo 1 h a 37 OC. Variable normal: incubación del suero positivo 2 h a temperatura ambiente.



En segundo lugar, evaluamos el bloqueo y la dilución del conjugado en soluciones de BSA a concentraciones de 0,1, 0,5, y 1% (Figura 3). Se observó que no existen diferencias significativas con las variables modificadas al compararlas con las condiciones de bloqueo y conjugados establecidas en la estandarización (bloqueo con leche descremada 0,5% y conjugado en leche descremada al 1%) ($p > 0,05$).

Figura 4. Robustez. Evaluación de las muestras diluidas en leche descremada al 3% en PBS, pH 7,4 en Tween 20 al 0,05% (variable modificada). Variable normal: muestras diluidas en PBS, pH 7,4 en Tween 20 al 0,05%.



Por último, variamos el diluyente de las muestras, utilizando en este caso, leche descremada al 3% en tampón PBS, pH 7,4, en Tween 20 al 0,05%. Como se observa en la Figura 4 no se mostró diferencia significativa con respecto a la dilución de las muestras en tampón PBS, pH 7,4 en Tween 20 al 0,05% ($p > 0,05$). Estos resultados nos demuestran que pequeños cambios ocasionados a la técnica no conllevan a variaciones apreciables en los títulos de anticuerpos determinados mediante el inmunoensayo. Es por ello que podemos afirmar que nuestra técnica es robusta y nos brinda un margen de confiabilidad en la evaluación de la inmunogenicidad de los candidatos vacunales.

Basados en los resultados obtenidos podemos considerar nuestro ensayo validado. Como se pudo apreciar existió un cumplimiento satisfactorio de todos los parámetros de estandarización y validación del inmunoensayo. Las pautas metodológicas marcadas en la estandarización y validación del ensayo nos permitieron llegar a establecer un método homogéneo que nos permitirá evaluar con alta reproducibilidad y confiabilidad la detección de anticuerpos séricos *in vitro* en el suero de humanos inoculados con candidatos vacunales contra cólera.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Reunión sobre la vacuna contra cólera. Informe Final. Washington, D.C. 1991
2. Benítez JA, García A, Silva A, García H, Fando R, Cedré B, et al. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX Φ -negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infection and Immunity*. 1999; 67:539-545.
3. Svennerholm AM, Sack DA, Holmgren J. y Bardhan PK. Intestinal antibody responses after immunization with cholera B subunit. *Lancet*. 1982:305-308.
4. Cedré B, García H, García L. y Talavera A. Estandarización y Evaluación del Ensayo Vibriocida modificado. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 1999; 51(3):156-159.
5. Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. Prácticas adecuadas para la fabricación de productos farmacéuticos. Ginebra, 1992. Serie de Informes Técnicos No 823, Anexo 1.
6. Mosley A, Benenson A y Berno S. Serological studies in cholera.2. The vibriocidal antibody response of cholera patients determined by a microtechnique. *Bull W. H. O*. 1968; 38:277-85.
7. Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, García IL., Izquierdo PL, Sotolongo PF, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis* protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Annals*. 1991; 14:195-207.
8. Klein M. AIDS and HIV vaccines. *Vaccine*. 1999; 17(2):65-70.
9. Nerey M, Ochoa R, Martínez JC, Licea T, Ferriol X, García AM, y col. Validación de un Elisa para la cuantificación de IgG humana anti-polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C. *Biología Aplicada*. 1999; 16:113-115.
10. 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. *Biología Aplicada*. 2000; 17:183-186.
11. Little Laureen E. Validation of immunological and Biological Assays. *BioPharmaceutical*. 1995; 36-42.
12. Anderson EL, Bowers T. y Mink CM. Safety and immunogenicity of meningococcal A and C polysaccharide conjugate vaccine in adults. *Infection and Immunity*. 1994; 62:3391-3395.
13. Sokoll LJ. y Chan DW. Clinical analyzers. Immunoassays. *Analytical Chemistry*. 1999; 71:356R-62R.
14. Ochoa R, Martínez JC., Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R, et al. Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor*. 1999; 8(10): 9-13.
15. Broughton PMG, Bergonzi C, Lindstedt G, Loeber IG, Malan PG, Mathieu M. y Pozet S. Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use. En: Part 1. Quantitative tests. London: European Committee for Clinical Laboratory Standards. 1986: 3.
16. Chaloner-Larsson G, Anderson R. y Egan AA. WHO Guide to Goodmanufacturing Practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Validation of analytical assays. Geneva, WHO. 1997; 65-95.
17. Tijssen P. The immobilization of immunoreactants on solid phases. En: Burdon RH, van Knippenberg PH. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and theory of enzyme immunoassays. Amsterdam, London, New York, Tokyo, Elsevier. 1993:297-328.
18. Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X., Blanco R. Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor*. 2000; 9(1):17-20.

Validation of an ELISA assay to determine antibodies against LPS of *Vibrio Cholerae*

Abstract

In order to evaluate the immunological response to any vaccine candidate, it is necessary to have standardized and validated laboratory techniques. For this reason the standardization of an indirect ELISA, used for determining serum antibodies against Ogawa LPS to cholera in sera of humans inoculated orally, was carried out; as well as the evaluation of the typical validation parameters for this assay. The optimal conditions for the coating concentration, blocking conditions and conjugate dilution were evaluated to select the best results for the positive control, the negative control and the blank. A 25 µg/mL concentration of Ogawa LPS in PBS left overnight for coating, 0,5% skimmed milk in PBS during 30 min at room temperature for blocking and anti-IgA-HRP diluted 1:5000 as conjugate were found to be the optimal variants for the assay. With respect to the technique validation, the parameters evaluated were precision, exactness, detection limit, specificity and robustness. A validation protocol allowing their evaluation was carried out. In all cases the assay was considered adequate, if the variation coefficient was less than 20%. For all the parameters evaluated this requisite was fulfilled, so that the results were considered to be reliable and reproducible.

Keywords: Cholera, ELISA, standardization, validation.