

# Validación de un ELISA tipo inhibición para cuantificar polisacárido Vi en la vacuna antitifoídica cubana vax-TyVi®

Esther María Fajardo, Ileana Delgado, Luis Riverón, Luis Izquierdo, Nuris Iglesias, Eduardo Álvarez, Alicia Perojo, Nadia Costa, Yolexis Tamayo, Eylín Jorge, Belkis Hernández, Yonaydi Díaz, Argentina Cruces, Niurka Gutiérrez, Ana Cristina Puig, Aleida Mandiarote, Roselyn Martínez, Daniel Cardoso

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. A.P. 16017, C.P. 11600.  
Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: efajardo@finlay.edu.cu

Se describe la validación de un ELISA tipo inhibición, reportado por primera vez en la literatura científica para cuantificar un antígeno vacunal: el polisacárido Vi de *Salmonella* Typhi, para ser empleado en el control de la calidad de la vacuna antitifoídica cubana vax-TyVi®. El ensayo consta de seis pasos: 1) Recubrimiento de placa de reacción con poli-L-lisina y posteriormente polisacárido Vi; 2) Bloqueo con leche descremada; 3) Inhibición o neutralización en tubos de suero anti-Vi de conejo, respectivamente, con polisacárido Vi de Curva de Calibración (concentraciones desde 1–32 µg/mL), control positivo y muestras de vacuna (3 diluciones); 4) Neutralización de anticuerpos anti-Vi libres, presentes en las mezclas anteriores, por el Polisacárido de Recubrimiento; 5) Reconocimiento de anticuerpos anti-Vi unidos a la placa (conjugado anti-IgG de conejo-fosfatasa alcalina) y 6) Revelado por reacción enzima-sustrato. Los parámetros de validación estudiados y sus resultados fueron: 1) Precisión, expresada como coeficiente de variación a tres niveles de concentración de polisacárido, comprendidos en el rango de su especificación (35, 50 y 70 µg/mL) y evaluada en términos de repetibilidad; precisión intraensayos (cuatro analistas) y reproducibilidad (seis analistas): ≤ 20%; 2) Linealidad ( $100 \cdot R^2$ ): 99,68 %; 3) Límite de detección: 0,5 µg/mL; 4) Exactitud (recuperación para las tres diluciones de la muestra: entre 100 y 118%), y 5) Robustez: no influye 1,5 h de bloqueo ( $p = 0,52$ ) ni ± 5 min para leer placa ( $p = 0,56$ ); influye grandemente la calidad del agua ( $p = 0,026$ ), a favor del agua para inyección. El ensayo es adecuado para los fines propuestos y es una medida de la inmunogenicidad *in vitro* del polisacárido Vi.

**Palabras clave:** ELISA, polisacárido Vi, *Salmonella* Typhi, vacuna antitifoídica

## Introducción

La fiebre tifoidea es todavía una enfermedad común, que presenta cifras importantes de morbilidad y mortalidad en países que no han podido lograr el control adecuado del agua potable, los alimentos y el tratamiento de las aguas de albañal (1). Su prevención puede lograrse con una vacuna apropiada. Se han empleado para estos fines vacunas de administración oral (2), cuyo uso masivo no es posible debido a su alto precio y eficacia variable y vacunas de administración parenteral, constituidas por células inactivadas (altamente reactogénicas y de baja eficacia), y más recientemente, de polisacárido capsular (Vi), purificado a partir del microorganismo causal (la bacteria *Salmonella* Typhi), de eficacia probada y muy baja reactogenicidad (1, 3, 4). La vacuna antitifoídica cubana vax-TyVi® pertenece a este último tipo. Su baja reactogenicidad, elevada inmunogenicidad y alta eficacia la hacen comparable con otras vacunas existentes en el mercado (5, 6, 7). Está incluida en el Esquema Nacional de Inmunizaciones de Cuba desde el año 2002.

De acuerdo con las exigencias internacionales (8, 9), la cuantificación del contenido de polisacárido Vi mediante un método inmunológico es un ensayo de laboratorio imprescindible para la liberación de los lotes de vacuna. Estos documentos reguladores no describen ninguna metodología específica, sólo señalan que el método debe ser aprobado por la autoridad reguladora nacional, para garantizar que la dosis aplicada contenga 25 µg del polisacárido, con una desviación aceptable de 30% (8) o 20% (9).

El ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) es el método inmunológico más empleado en el laboratorio para estos fines. Diferentes tipos de ELISA aparecen descritos en la literatura científica para cuantificar antígenos (10, 11), siendo el más empleado el tipo “sandwich” (sencillo y doble) por su sencillez y consistencia, pero reportado casi siempre para antígenos de naturaleza proteica y haptenos.

El polisacárido Vi es un homopolímero lineal de poli- $\alpha(1 \rightarrow 4)$ GalNAc con grupos O-acetilo en la posición C-3, y adquiere formas en espiral con simetrías de plegamientos dobles o triples; los grupos O-acetilo son los responsables de su inmunogenicidad y son muy importantes para la unión con los anticuerpos anti-Vi (12). Debido a la complejidad de la estructura de este antígeno vacunal y al protagonismo de los grupos O-acetilo en sus propiedades inmunológicas se consideró que la unión de los anticuerpos anti-Vi al polisacárido podría ser más eficiente en un medio donde ambos estuvieran en solución. En ese caso, el ELISA tipo inhibición (10) resultó más atractivo y fue el método empleado para desarrollar la técnica de cuantificación de polisacárido Vi vacunal.

El presente trabajo tuvo como objetivo el diseño y ejecución de la validación del ELISA tipo inhibición desarrollado con el fin de cuantificar polisacárido Vi de *Salmonella* Typhi, para considerar su empleo en el control de la calidad de la vacuna antitifoídica cubana vax-TyVi®.

## Materiales y Métodos

**ELISA de inhibición.** La estandarización previa de la técnica incluyó la preparación y caracterización de los materiales de referencia necesarios (polisacárido Vi para recubrimiento, curva de calibración y control positivo, preparados a partir de lotes obtenidos en la etapa de desarrollo tecnológico de la vacuna) y el establecimiento de las concentraciones óptimas de los reactivos involucrados, ya que los tiempos y temperaturas de incubación se definieron de antemano, teniendo en cuenta los reportes de la literatura (10, 11) y la experiencia profesional. La técnica requiere de seis pasos: (1) Recubrimiento de la placa de reacción (NUNC, Maxisorp) con poli-L-lisina (SIGMA, EUA) 20 µg/mL, 1 h, 20-25 °C, según lo reportado por Ochoa y col. (13) con algunas modificaciones y posteriormente polisacárido Vi, 1 µg/mL, 16-18 h, 2-8 °C; (2) Bloqueo con leche descremada 3% (Merck, Alemania), 1 h 20-25 °C; (3) Inhibición o neutralización en tubos de suero anti-Vi de conejo diluido 1:100 (E.P.B. "Carlos J. Finlay", Cuba), en proporción 1:1 (v/v), respectivamente, con polisacárido Vi de Curva de Calibración (diluciones doble seriadas desde 1-32 µg/mL), control positivo y muestras de vacuna (3 diluciones, factor 1,5; desde 1:2 hasta 1:4,5), 1 h, 37 °C; (4) Neutralización de anticuerpos anti-Vi libres (presentes en las mezclas anteriores), por Polisacárido de Recubrimiento (1 h, 37 °C); (5) Reconocimiento de anticuerpos anti-Vi unidos a la placa empleando un conjugado monoclonal anti-IgG de conejo-fosfatasa alcalina (SIGMA, EUA), dilución 1:20 000, 1 h, 37 °C; (6) Revelado por reacción enzima-sustrato (p-nitrofenil-fosfato 1 mg/mL, SIGMA, EUA, en solución reguladora de dietanolamina, pH 9,8) 30 min, 20-25 °C; la reacción enzimática se detuvo con solución de hidróxido de sodio 2 N, 50 µL por pocillo. Las lecturas se realizaron en un lector de placas (Labsystems,

Finlandia) a una longitud de onda de 405 nm. El volumen de reacción en todos los casos fue de 100 µL por pocillo. Después de cada paso se realizaron 4 lavados de la placa de reacción, con 300 µL de volumen por pocillo, empleando un lavador automático (Skatron, Noruega). La solución de lavado fue agua para inyección con 0,05% de Tween 20 (Merck, Alemania), excepto para el paso posterior a la poli-L-lisina, donde se usó tampón fosfato salino 0,15 M, pH 7,4 (PBS). El diluyente empleado para las muestras, curva, control positivo y conjugado fue PBS con 0,05% de Tween 20 y leche descremada al 3% (PBSTL).

El cálculo de la concentración de polisacárido Vi de las muestras se realizó mediante el método matemático logistic-log (14), empleando un programa computadorizado diseñado para este fin (15). Como se trata de un ELISA tipo inhibición, donde las muestras más concentradas generan valores de absorbancia menores y viceversa, la pendiente de la curva de calibración es negativa. Para poder utilizar el programa de cálculo desarrollado por Plikaytis y col. (15) se empleó la transformación  $Y = K - X$ , ( $Y$  = concentración;  $K$  = MáxAbs y  $X$  = Abs) para garantizar que  $Y$  fuese siempre positiva. MáxAbs es el valor máximo de absorbancia obtenido en la placa, que se corresponde con el blanco de la curva de calibración. MáxAbs-Abs siempre será mayor o igual a cero y creciente. El programa funciona solamente cuando la magnitud que se ajusta es una función creciente de la concentración, por lo que esta transformación es imprescindible para calcular los valores de concentración de las muestras de polisacárido Vi.

Toda la metodología del ensayo se describe en su correspondiente Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) (16). La adición a la placa de reacción de la curva, muestras y el control positivo se presenta en el Esquema 1.

**Esquema 1. Placa de reacción para adicionar la curva, muestras y el control positivo**

	CURVA (µg/mL)			MUESTRAS Y CONTROL POSITIVO								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	Blanco	Blanco	CP-1	CP-1	CP-1	CP-2	CP-2	CP-2	CP-3	CP-3	CP-3
B	0,5	0,5	0,5	A-1	A-1	A-1	A-2	A-2	A-2	A-3	A-3	A-3
C	1,0	1,0	1,0	B-1	B-1	B-1	B-2	B-2	B-2	B-3	B-3	B-3
D	2,0	2,0	2,0	C-1	C-1	C-1	C-2	C-2	C-2	C-3	C-3	C-3
E	4,0	4,0	4,0	A-1	A-1	A-1	A-2	A-2	A-2	A-3	A-3	A-3
F	8,0	8,0	8,0	B-1	B-1	B-1	B-2	B-2	B-2	B-3	B-3	B-3
G	16,0	16,0	16,0	C-1	C-1	C-1	C-2	C-2	C-2	C-3	C-3	C-3
H	Dil.	Dil.	Dil.	CP-1	CP-1	CP-1	CP-2	CP-2	CP-2	CP-3	CP-3	CP-3

\*Se indican por cada lote las diluciones realizadas a cada uno de los tres frascos ensayados para el caso del producto envasado (A, B y C); la zona sombreada corresponde a un lote y la clara al otro. En el caso del producto a granel las letras A, B y C se corresponden con diferentes lotes, en ambas zonas. **1:** Dilución 1:4; **2:** Dilución 1:6 y **3:** Dilución 1:9. CP: control positivo, diluido igual que las muestras. Dil: Diluyente (PBSTL).

## Validación

Por tratarse de un ensayo cuantitativo destinado a cuantificar el principal componente del producto (polisacárido Vi) se evaluaron los siguientes parámetros: Precisión (repetibilidad o precisión intraensayo; precisión intermedia o interensayos y reproducibilidad o precisión interlaboratorios), exactitud, linealidad, límite de detección y robustez (17, 18).

**Muestras:** Lote W de la vacuna antitifoídica de polisacárido Vi purificado (lote de escalado productivo, Instituto Finlay, Cuba) y sus diluciones para 35, 50 y 70 µg/mL (tres niveles de concentración: bajo, medio y alto), que se consideraron como muestras diferentes.

**Materiales de Referencia:** Materiales de Referencia de Trabajo caracterizados durante el proceso de estandarización (polisacárido Vi para recubrimiento, curva de calibración y control positivo) y aprobados para su uso (19, 20). Para el ensayo de exactitud se empleó la vacuna Typhim Vi (Aventis Pasteur, Francia), lote T1120, con 47,2 µg/mL de concentración de polisacárido Vi.

### Esquema 2. Placa para el ensayo de precisión (intraensayo, interensayos e interlaboratorios)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	a	a	a	b	b	b	c	c	c
B	0,5	0,5	0,5	c	c	c	c	c	c	a	a	a
C	1	1	1	b	b	b	a	a	a	b	b	b
D	2	2	2	C+ a	C+ a	C+ a	C+ b	C+ b	C+ b	C+ c	C+ c	C+ c
E	4	4	4	b	b	b	b	b	b	a	a	a
F	8	8	8	a	a	a	c	c	c	b	b	b
G	16	16	16	c	c	c	a	a	a	c	c	c
H	Dil.	Dil.	Dil.	b	b	b	c	c	c	a	a	a

#### CURVA

**Columnas 1, 2 y 3:** Puntos de la curva de calibración (en µg/mL)

**B:** Blanco de la curva (blanco reactivo)

**C+:** Control positivo de polisacárido Vi – a: Dilución 1:4; -b: Dilución 1:6; -c: Dilución 1:9

**Muestra en estudio** – a: Dilución 1:4; -b: Dilución 1:6; -c: Dilución 1:9; Dil. diluyente (PBSTL)

**Precisión intermedia (precisión interensayos).** Se realizó el ensayo igual al anterior, bajo diferentes condiciones de operación, diferentes reactivos, diferentes analistas (cuatro) y en días distintos, en el mismo laboratorio. Se calculó la concentración de polisacárido Vi para cada muestra, igual que para la repetibilidad. Posteriormente, se calculó la concentración de polisacárido Vi para cada una de las tres diluciones, tomando los resultados de los cuatro ensayos realizados, el valor promedio de concentración de polisacárido Vi para cada dilución, la DE y el CV. Se consideró como criterio de aceptación un  $CV \leq 20\%$ .

**Reproducibilidad (precisión interlaboratorios).** Se realizó el ensayo igual al anterior, bajo diferentes condiciones de operación, diferentes reactivos, diferentes analistas (dos) y en días distintos, en

**Blanco:** Solución de PBST con leche descremada al 3% (PBSTL).

**Cálculos:** Se empleó el programa computadorizado Microsoft Excel para calcular promedio, Desviación Estándar (DE) y Coeficiente de Variación (CV). El programa Statistica for Windows se empleó para realizar análisis de varianza y t de Student.

## Precisión

**Repetibilidad (precisión intraensayo).** Las muestras se evaluaron según el PNO correspondiente (16). Se empleó una placa diferente para cada muestra, como se observa en el Esquema 2. El ensayo se realizó bajo las mismas condiciones de operación, por el mismo analista, con iguales reactivos y soluciones y en el mismo día. Se calculó (i) el valor de la concentración de polisacárido Vi (µg/mL) para cada una de las tres diluciones adicionadas por triplicado, en las siete posiciones diferentes de la placa; (ii) el valor de la concentración de polisacárido Vi (valor promedio para cada dilución), la DE y el CV. Se consideró como criterio de aceptación un  $CV \leq 20\%$ .

otro laboratorio. Se calculó la concentración de polisacárido Vi para cada dilución y para la muestra, según lo descrito anteriormente. Para el cálculo final se tomaron los resultados de los cuatro analistas del ensayo de precisión intermedia, más los obtenidos por los dos analistas del nuevo laboratorio (seis analistas en total). Se calculó la concentración de polisacárido Vi para cada una de las tres diluciones, el valor promedio de concentración de polisacárido Vi para cada dilución, la DE y el CV. Se consideró como criterio de aceptación un  $CV \leq 20\%$ .

**Exactitud:** Se evaluaron tres muestras de la vacuna antitifoídica Typhim Vi (Aventis Pasteur, Francia), de concentración conocida (47,2 µg/mL), siguiendo el PNO del ensayo (16). En el Esquema 3 se calculó el valor de concentración promedio de las tres muestras,

para cada una de las tres diluciones ensayadas, la DE y el CV. También se calculó el valor de concentración en cada una de las tres muestras ensayadas, según establece el PNO, y el promedio de los valores de concentración de las tres muestras. Se comparó el valor esperado (reportado por el fabricante) con el valor promedio

obtenido. Se calculó la exactitud sobre la base del porcentaje de recuperación (% R), según la relación  $[\text{Concentración medida}/\text{Concentración conocida}] \times 100$ . También se calculó el porcentaje de recuperación (% R) para cada dilución por separado. Se consideró como criterio de aceptación  $\% R = 100 \% \pm 20\%$ .

### Esquema 3 . Placa para el ensayo de exactitud

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	B	B	B	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.
<b>B</b>	0,5	0,5	0,5	M1-a	M1-a	M1-a	M1-b	M1-b	M1-b	M1-c	M1-c	M1-c
<b>C</b>	1	1	1	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.
<b>D</b>	2	2	2	M2-a	M2-a	M2-a	M2-b	M2-b	M2-b	M2-c	M2-c	M2-c
<b>E</b>	4	4	4	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.
<b>F</b>	8	8	8	M3-a	M3-a	M3-a	M3-b	M3-b	M3-b	M3-c	M3-c	M3-c
<b>G</b>	16	16	16	C+-a	C+-a	C+-a	C+-b	C+-b	C+-b	C+-c	C+-c	C+-c
<b>H</b>	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.	Dil.

#### CURVA

**Columnas 1, 2 y 3:** Puntos de la curva de calibración (en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); **B:** Blanco de la curva (blanco reactivo)

**C+:** Control positivo de polisacárido Vi – a: Dilución 1:4; -b: Dilución 1:6; -c: Dilución 1:9

**M1, M2 y M3:** Envases diferentes de la muestra (comercial) con concentración de polisacárido Vi conocida; - a: Dilución 1:4; -b: Dilución 1:6; -c: Dilución 1:9; **Dil.** diluyente (PBSTL)

**Linealidad.** Se evaluaron cuatro curvas en la placa de reacción, con su respectivo control positivo, según el Esquema 4. Se calcularon los promedios de los valores de absorbancia, con sus respectivas DE y CV, para cada uno de los puntos de las cuatro curvas de calibración, el blanco y las diluciones del control positivo. Se obtuvo el coeficiente de determinación ( $100 \cdot R^2$ ) de cada una de las cuatro curvas y la concentración de polisacárido Vi del control positivo empleando el programa de Plikaytis y col. (15). Se consideró como

criterio de aceptación que el coeficiente de determinación ( $100 \cdot R^2$ ) fuese  $\geq 98\%$  y que el valor de concentración de polisacárido Vi del control positivo se encontrase en el límite del intervalo declarado en su certificado de Material de Referencia (41–55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Este programa rechaza las curvas que no cumplan con los criterios establecidos en su algoritmo, basado en el método matemático logistic-log (14).

### Esquema 4. Placa para el ensayo de linealidad

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
<b>B</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>C</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>D</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>E</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>F</b>	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
<b>G</b>	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
<b>H</b>	C+-a	C+-a	C+-a	C+-b	C+-b	C+-b	C+-c	C+-c	C+-c	Dil.	Dil.	Dil.

CURVA 1

CURVA 2

CURVA 3

CURVA 4

**Columnas 1-2-3; 4-5-6; 7-8-9 y 10-11-12:** Puntos de la curva de calibración (en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

**B:** Blanco de la curva (blanco reactivo)

**C+:** Control positivo de polisacárido Vi – a: Dilución 1:4; -b: Dilución 1:6; -c: Dilución 1:9; **Dil.** diluyente (PBSTL)

**Límite de detección.** Se emplearon los datos obtenidos del ensayo de linealidad. Se analizaron los valores de absorbancia de los blancos y puntos de la Curva de Calibración y se consideró como Límite de Detección el menor valor de concentración de la curva cuya absorbancia difiriera del blanco (17).

**Robustez.** Se evaluaron tres variables: (i) agua para el lavado de las placas de reacción (agua destilada y agua para inyección); (ii) tiempo de bloqueo de las placas (extensión hasta 1,5 h) y (iii) tiempo de lectura de la placa de reacción (25, 30 y 35 min después de añadido el sustrato). Para (i) y (ii) se ensayaron dos placas en paralelo, como se muestra en el Esquema 5. Una de las placas se trabajó siguiendo

fielmente las condiciones establecidas en el PNO (control) y la otra placa se sometió a la variable estudiada. En el caso de (iii), se evaluó solamente una placa, la cual fue leída a los diferentes intervalos de tiempo, una vez añadido el sustrato. Para todos los casos se calculó la concentración de polisacárido Vi del control positivo. Los valores obtenidos en las placas sometidas a las variables se compararon con aquellos de la placa control mediante análisis de varianza y la prueba t de Student. El ensayo se consideró robusto si no existían diferencias significativas entre las varianzas y valores promedio de concentración de polisacárido Vi del control positivo, para un nivel de probabilidad  $p > 0,05$ .

**Esquema 5. Placa para el ensayo de robustez**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	B	B	B	C+-a	C+-a	C+-a	C+-b	C+-b	C+-b	C+-c	C+-c	C+-c
<b>B</b>	0,5	0,5	0,5	C+-a	C+-a	C+-a	C+-b	C+-b	C+-b	C+-c	C+-c	C+-c
<b>C</b>	1	1	1	C+-a	C+-a	C+-a	C+-b	C+-b	C+-b	C+-c	C+-c	C+-c
<b>D</b>	2	2	2	C+-a	C+-a	C+-a	C+-b	C+-b	C+-b	C+-c	C+-c	C+-c
<b>E</b>	4	4	4	C+-a	C+-a	C+-a	C+-b	C+-b	C+-b	C+-c	C+-c	C+-c
<b>F</b>	8	8	8	C+-a	C+-a	C+-a	C+-b	C+-b	C+-b	C+-c	C+-c	C+-c
<b>G</b>	16	16	16	C+-a	C+-a	C+-a	C+-b	C+-b	C+-b	C+-c	C+-c	C+-c
<b>H</b>	Dil.	Dil.	Dil.	C+-a	C+-a	C+-a	C+-b	C+-b	C+-b	C+-c	C+-c	C+-c

**CURVA**

**Columnas 1, 2 y 3:** Puntos de la curva de calibración (en  $\mu\text{g/mL}$ )

**B:** Blanco de la curva (blanco reactivo)

**C+:** Control positivo de polisacárido Vi – **a:** Dilución 1:4; **-b:** Dilución 1:6; **-c:** Dilución 1:9

**Dil.** diluyente (PBSTL)

**Resultados y Discusión**

Cuantificar el principio activo de un medicamento es tarea importante. De la precisión y la exactitud del método empleado dependerá el éxito del producto, pues de la dosis aplicada del principio activo resultará el efecto para el cual el medicamento ha sido diseñado.

Las vacunas se administran en pequeñas dosis, sólo en algunos momentos de la vida, por tanto, esta cuantificación es vital para el producto. Es conocido que los ensayos basados en la reacción antígeno-anticuerpo tienen una imprecisión mayor que los ensayos colorimétricos, generalmente empleados para estos fines (10, 17), debido a la naturaleza compleja de esa reacción; lo mismo sucede con la exactitud.

La selección de un método inmunoquímico apropiado para cuantificar polisacárido Vi en la vacuna antitifoídica vax-TyVi<sup>®</sup> fue un gran reto que exigió un trabajo riguroso para lograr que el ensayo fuese confiable y reproducible. La validación de esta técnica resultaba imprescindible para considerarla apropiada para su uso en el control de calidad, del cual depende la liberación de los lotes del producto, ya que la validación es el proceso por el cual queda establecida la fiabilidad de un procedimiento y es la manera de

demostrar la integridad científica y uso práctico de un método nuevo (20). La mayoría de las guías existentes sobre validación (17, 18) establecen los conceptos y los parámetros a evaluar de manera muy general, de acuerdo con el método analítico en cuestión. El diseño de la validación empleado en el presente trabajo se realizó teniendo en cuenta estos principios generales, adaptados a la técnica que nos ocupa y mostró ser apropiado, ya que los resultados obtenidos para cada parámetro estudiado, se encontraron dentro de los criterios de aceptación establecidos, como se verá más adelante.

Con relación a la evaluación de la precisión, la Tabla 1 muestra un ejemplo de la recogida de datos para los tres niveles de concentración de polisacárido Vi estudiados (35, 50 y 70  $\mu\text{g/mL}$ ), realizado por un analista. El análisis de datos semejantes obtenidos por diferentes analistas generó los resultados de la precisión intra e interensayos e interlaboratorios que se muestran en la Tabla 2. El CV tomado para la precisión intraensayo fue el mayor obtenido para la muestra en cuestión, por cualesquiera de los analistas involucrados. Como se puede observar en la Tabla 3, en ningún caso el CV fue mayor del 20%, por lo que se consideró satisfactoria para los tres niveles de concentraciones estudiados.

Los resultados de la exactitud se muestran en la Tabla 4. La recuperación estuvo dentro del intervalo establecido ( $100\% \pm 20\%$ ),

con una tendencia a la sobrestimación del valor de la concentración en las tres diluciones. La dilución 1:6 de la muestra 1 presentó un valor diferente del resto de las réplicas, pero como su CV estuvo por debajo de 20% fue aceptado. En esa dilución se observó la mayor sobrestimación y también el mayor CV. Es muy importante tener en

cuenta esta característica, sobre todo en el caso de muestras de vacunas cuyos valores se encuentren cerca del mínimo establecido, ya que se corre el riesgo de liberar un producto con un contenido por debajo del requerido.

**Tabla 1. Ejemplo de recogida de datos empleado por cada uno de los analistas para el ensayo de precisión realizado a muestras con tres niveles diferentes de concentración de polisacárido Vi (bajo, medio y alto)**

Muestra de 35 µg/mL				Muestra de 50 µg/mL				Muestra de 70 µg/mL			
Dil 1:4	Dil. 1:6	Dil 1:9		Dil 1:4	Dil. 1:6	Dil 1:9		Dil 1:4	Dil. 1:6	Dil 1:9	
Concent.	Concent.	Concent.		Concent.	Concent.	Concent.		Concent.	Concent.	Concent.	
36,05	37,17	32,40		44,56	54,70	58,57		50,84	66,84	75,40	
34,07	36,83	36,42		50,28	46,28	51,22		58,43	70,12	84,21	
31,31	33,31	33,99		43,07	47,43	54,27		56,42	72,47	86,01	
32,06	36,57	32,11		44,77	47,09	56,95		54,32	69,28	78,84	
32,18	34,31	38,15		45,77	50,68	58,18		51,48	67,81	83,81	
32,80	36,08	31,52		45,74	51,51	58,99		55,92	66,57	83,81	
37,05	43,07	42,00		58,72	64,68	73,22		59,26	80,31	98,51	
Promedio	33,65	36,76	35,23	Promedio	47,56	51,77	58,77	Promedio	55,24	70,49	84,37
DS	2,17	3,12	3,85	DS	5,41	6,42	6,95	DS	3,23	4,80	7,24
<b>CV</b>	<b>6,5</b>	<b>8,5</b>	<b>10,9</b>	<b>CV</b>	<b>11,4</b>	<b>12,4</b>	<b>11,8</b>	<b>CV</b>	<b>5,8</b>	<b>6,8</b>	<b>8,6</b>
<b>Promedio: 35,21</b>				<b>Promedio: 52,70</b>				<b>Promedio: 70,03</b>			
DS: 3,24				DS: 7,62				DS: 13,20			
<b>CV: 9,2</b>				<b>CV: 14,5</b>				<b>CV: 18,9</b>			

**Tabla 2. Resultados del ensayo de precisión**

Muestra	Repetibilidad	Precisión intermedia	Reproducibilidad
Concentración de	(Precisión intraensayo)	(Precisión interensayos)	(Precisión interlaboratorios)
Polisacárido Vi	(Máxima de todos los analistas)	(4 analistas)	(6 analistas)
µg/mL	CV (%)	CV (%)	CV (%)
35	16,6	18,8	17,2
50	15,9	17,0	17,7
70	19,8	19,5	19,8

**Tabla 3. Resultados de repetibilidad (precisión intraensayo) de cada uno de los 6 analistas evaluados**

Muestra	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Analista 4	Analista 5	Analista 6
Concentración de	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
Polisacárido Vi						
µg/mL						
35	9,2	12,2	15,9	16,6	12,8	13,1
50	14,5	11,7	13,8	13,7	15,9	15,2
70	18,9	12,4	8,9	13,7	17,4	19,8

**Tabla 4. Validación. Resultados del ensayo de exactitud**

Muestra	Valor conocido	Concentración de polisacárido Vi (µg/mL)						% R (De 80-120)	Cumple	
		Valor obtenido (Cantidad medida)							Sí	No
		Dilución 1:4	Dilución 1:6	Dilución 1:9	Media	CV (%)				
MC1	47,2	51,6	64,6	53,3	56,6	12,3	120	x		
MC2	47,2	50,6	49,6	55,6	51,9	6,2	110	x		
MC3	47,2	49,00	53,7	52,5	51,7	4,7	110	x		
		Media	Media	Media						
		50,4	56,0	53,9						
		CV (%)	CV (%)	CV (%)						
		2,6	13,9	2,9						
		% R (De 80-120)	% R (De 80-120)	% R (De 80-120)						
		107	118	114						
		Cumple	Cumple	Cumple						
		Sí No	Sí No	Sí No						
		x	x	x						

Promedio de concentración de polisacárido Vi calculado a partir de las tres muestras estudiadas:  
 53,4 µg/mL  
 DE: 2,77  
 CV (%): 5,19  
 % R del ensayo: 113%

La linealidad también resultó satisfactoria, como se muestra en la Tabla 5. El requisito establecido para la curva del modelo logistic-log (14) empleado ( $y = a + b/[1 + c(x^d)]$ ) fue un valor de  $(100 \cdot R^2) \geq 98,0$  y para el control positivo valores comprendidos en su intervalo reportado (41–55 µg/mL). Debe señalarse que el programa utilizado para los cálculos (15) elimina las curvas que no cumplen con los parámetros establecidos en su algoritmo y en nuestro caso, todas fueron aceptadas.

**Tabla 5. Resultados del ensayo de linealidad**

Curva No.	(100·R <sup>2</sup> )	Concentración del control positivo (µg/mL)		CUMPLE	
				SI	NO
1	98,68	44,5		X	
2	99,43	44,6		X	
3	99,90	54,9		X	
4	99,60	45,2		X	

Las variables que se escogieron para realizar el ensayo de robustez (calidad del agua, extensión del tiempo de bloqueo y tiempo de lectura de la placa una vez añadido el sustrato) son las que más frecuentemente pueden afectar el ensayo en las condiciones reales de su ejecución, ya que otras como el tiempo y la temperatura de incubación, lavados, etc. pueden controlarse más fácilmente. Se obtuvo diferencia significativa ( $p = 0,026$ ) entre el agua destilada y el agua para inyección, a favor de esta última, demostrada a través de la prueba t de Student para muestras independientes. Esto no fue un

resultado inesperado, ya que se habían tenido repetidas evidencias de ello durante la etapa de estandarización; cuando se sustituía el agua para inyección por agua destilada, todos los valores de absorbancia siempre resultaban inferiores a los que normalmente se obtenían con el agua para inyección en el tiempo de incubación programado. Se conoce que las enzimas son moléculas cuya actividad se afecta por varios factores externos, como la temperatura, pH y sustancias inhibitoras o potenciadoras que pueden estar presentes en trazas en el agua empleada. Por ese motivo, se recomienda siempre utilizar agua bidestilada o agua ultrapura (10, 11). Los juegos de reactivos para diagnóstico por ELISA solicitan en sus instrucciones el uso de agua de este tipo (22). En este caso, el conjugado anti IgG de conejo-fosfatasa alcalina funciona a una alta dilución (1:20 000), por lo que cualquier inhibidor presente en el agua afecta grandemente la actividad enzimática. No hubo diferencias significativas entre 1 y 1,5 h de tiempo de bloqueo ( $p = 0,52$ ) ni para los tiempos de incubación de sustrato de 25, 30 y 35 min ( $p = 0,56$ ).

Además de permitir la cuantificación del contenido de polisacárido, el presente ELISA de inhibición se puede considerar también como un ensayo de antigenicidad *in vitro*. Para que el anticuerpo anti Vi pueda unirse al polisacárido, requiere de 6–8 grupos O-acetilo adyacentes. Eso sólo puede ocurrir cuando el polisacárido conserva en buen estado su estructura antigénica, o sea, que mantiene sus grupos O-acetilo, responsables de estimular la producción de anticuerpos en la persona vacunada (3, 4, 12). Un polisacárido que funcione en este ensayo está demostrando que es un buen antígeno vacunal.

Hasta donde conocemos, éste es el primer reporte en la literatura científica del uso del ELISA tipo inhibición para cuantificar polisacárido Vi en la vacuna antitifoídica. Los resultados de su validación demuestran que es apropiado para cuantificar el contenido de polisacárido Vi en la vacuna antitifoídica cubana vax-TyVi®.

## Conclusiones

La validación del ELISA tipo inhibición, reportado por primera vez para cuantificar polisacárido Vi y aplicado en este caso a la vacuna antitifoídica cubana vax-TyVi®, ha demostrado que cumple con los requisitos analíticos para ser empleado en el control de la calidad de este producto. Además, este ensayo demuestra indirectamente la integridad estructural del polisacárido Vi, por lo que puede también considerarse como un ensayo de antigenicidad *in vitro*.

## Referencias

1. WHO Background document: The diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever. WHO/V&B/03.07, 2003.
2. Levine MM, Ferreccio C, Black RE, Germanier R. Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet* 1987; 1(8541):1049-1052.
3. Klugman KP, Gilbertson IT, Koornhof HJ, Robbins JB, Schneerson R, Schulz D, Cadoz M, Armand J. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet* 1987; 2(8569):1165-1169.
4. Plotkin SA, Bouveret-Le Cam N. A new typhoid vaccine composed of the Vi capsular polysaccharide. *Arch Intern Med* 1995; 55:2293-2299.
5. Riverón L, Cardoso D et al. Vax-TyVi®: Vacuna Cubana de Polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. *Biotec Aplicada* 2003; 20(4):245-247.
6. Ochoa R, Baró M, Martínez JC, Mirabal M, Armesto M, Domínguez F. Seguridad e inmunogenicidad de una Vacuna de Polisacárido Vi de *Salmonella typhi* en Cuba. *Rev Cub Med Trop* 2003; 55(2):83-87.
7. Ochoa R, Martínez JC, Ginebra M, Ferriol X, Rodríguez V, Sotolongo F. Immunogenicity of a new *Salmonella typhi* Vi polysaccharide vaccine – vax-TyVi® - in Cuban school children and teenagers. *Vaccine* 2003; 21:2758-2760.
8. Requirements for Vi polysaccharide typhoid vaccine. WHO Tech Rep Series 1994; 840:14-33.
9. Typhoid polysaccharide vaccine. European Pharmacopoeia 2002, 4<sup>th</sup> Edition, Version 4.2, 07/2002:1160.
10. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. En: Burdon RH, van Knippenberg PH (Eds.). *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 15. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier, 1985.
11. Voller A, Bidwell DR, Bartlett A. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe, Borough House, Guernsey GB, 1979.
12. Szu AC, Li X, Stone AL, Robbins JB. Relation between structure and immunologic properties of the Vi capsular polysaccharide. *Infect Immun* 1991, 59 (12):4555-4561.
13. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R et al. Sensibilización de placas para ensayos inmunoenzimáticos con antígenos vacunales. *VacciMonitor* 2001; 10(4):14-17.
14. Plikaytis BD et al. Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods to quantitate *Neisseria meningitidis* Group A Polysaccharide Antibody levels by Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay. *J Clin Microb* 1991; 29(7):1439-1446.
15. Plikaytis BD, Holder PF, Carlone GM. Program ELISA for Windows User's Manual, version 1.00. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta GA, USA, 1996.
16. PNO 12-157. Determinación de la concentración de polisacárido Vi de *Salmonella Typhi* en la Vacuna Antitifoídica vax-TyVi, mediante ELISA. Instituto Finlay, Vicepresidencia de Calidad, 2001.
17. Chaloner-Larson G y cols. Guía de la OMS sobre los requisitos de las Prácticas Adecuadas de Fabricación (PAF). Segunda parte: Validación. WHO/VSQ/97.02. Ginebra, OMS, pp: 70-83, 1998.
18. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: Methodology. ICH, Nov. 1996.
19. PNO 15-011. Tarea Técnica para la preparación de Materiales de Referencia. Instituto Finlay, Dirección de la Calidad. 2001.
20. PNO 15-002. Preparación, caracterización e identificación de Materiales de Referencia. Instituto Finlay, Dirección de la Calidad. 2001.
21. Balls M, Fentem JH. Progress toward the validation of alternative tests. *ATLA* 1997, 25:33-43.
22. ImmunoELISA™. www.orgenics.com

## Validation of an inhibition-type ELISA for quantifying Vi polysaccharide content in the Cuban Typhoid Vaccine vax-TyVi™

### Abstract

Validation of an inhibition-type ELISA intended for quantifying a vaccine antigen, Vi polysaccharide from *Salmonella typhi*, is reported here for the first time in a scientific paper. It is devoted to the quality control of the Cuban typhoid vaccine vax-TyVi™. The test requires six steps: (1) Coating the plate with poly-L-lysine and then Vi polysaccharide; (2) Blocking with skimmed milk; (3) Inhibition (or neutralization) in tubes of rabbit Vi antiserum with Vi polysaccharide contained in the Standard Curve (concentrations from 1 – 32 µg/mL), Positive Control and vaccine samples (3 dilutions) respectively; (4) Neutralization of free Vi antibodies existing in the previous mixtures by the coating polysaccharide; (5) Recognition of Vi antibodies bonded to the plate (Anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase) and (6) Revealing by means of the enzyme-substrate reaction. The studied validation parameters and their results were: (1) Precision, expressed as the coefficient of variation, at three different polysaccharide concentration levels comprising the vaccine specification range (35, 50 and 70 µg/mL) and evaluated in terms of Repeatability, Intermediate Precision (four analysts) and Reproducibility (six analysts): ≤ 20%; (2) Linearity (100\*R<sup>2</sup>): 99.68%; (3) Detection Limit: 0.5 µg/mL; (4) Accuracy (recovery at three different sample dilutions): between 100 y 118%, and (5) Robustness: neither 1.5 h blocking nor ± 5 min for plate reading influences the test (p = 0.52 and 0.56 respectively); however, water quality greatly influences the results (p = 0.026); water for injection showed the best results. The test is appropriate for the purpose it was validated; it also allows evaluating *in vitro* immunogenicity of Vi polysaccharide.

**Keywords:** ELISA, Vi polysaccharide, *Salmonella typhi*, Typhoid Vaccine