

Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas

Rolando Ochoa, Juan C. Martínez, Xenia Ferriol, Eric Estrada, Ana M. García, Rosa Blanco, Franklin Sotolongo.

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

Se realizó una revisión sobre la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas para ensayos preclínicos y clínicos de vacunas, elaborándose una guía práctica. Se analizan los principios a usar y los pasos a seguir para la optimización de un ensayo, incluyendo la preparación de estándares y controles. Se exponen nuestras experiencias.

Palabras claves: Estandarización, inmunoensayos enzimáticos, ELISA, vacunas.

Introducción

Los ensayos *in vitro* han sido usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas o determinar el grado de protección en aquellos casos en que puedan establecerse correlatos de protección con pruebas *in vivo* (1, 2).

El principal mecanismo inmune estimulado por la mayor parte de las vacunas actuales, radica en la capacidad lítica, opsonizante, neutralizante o bloqueadora mediada por anticuerpos, de ahí que sea necesario su detección.

Si bien es cierto que las pruebas *in vivo* tienen la virtud de evaluar la capacidad funcional de los anticuerpos contra un inmunógeno específico, por otro lado son engorrosas, requieren personal altamente especializado, un gran número de animales y una gran cantidad de suero para su ejecución (1, 2). Algunas pruebas *in vitro* se han diseñado para simular los procesos que ocurren *in vivo*, lo que no deja de ser una aproximación. Estos métodos, aunque en menor grado, también son engorrosos (1, 3, 4).

Los ensayos *in vitro* no funcionales son útiles para demostrar la inmunogenicidad de un candidato vacunal y en algunos casos pueden correlacionarse con ensayos *in vivo*. Dentro de las técnicas *in vitro* más usadas se encuentran las pruebas de aglutinación pasiva, cuya principal desventaja es su mayor sensibilidad para anticuerpos de clase IgM, el radioinmunoensayo, de elevada sensibilidad pero con reactivos y equipamiento caros, representando el material radiactivo un riesgo potencial y los métodos inmunoenzimáticos, muy apropiados para pruebas de rutina, sensibles y

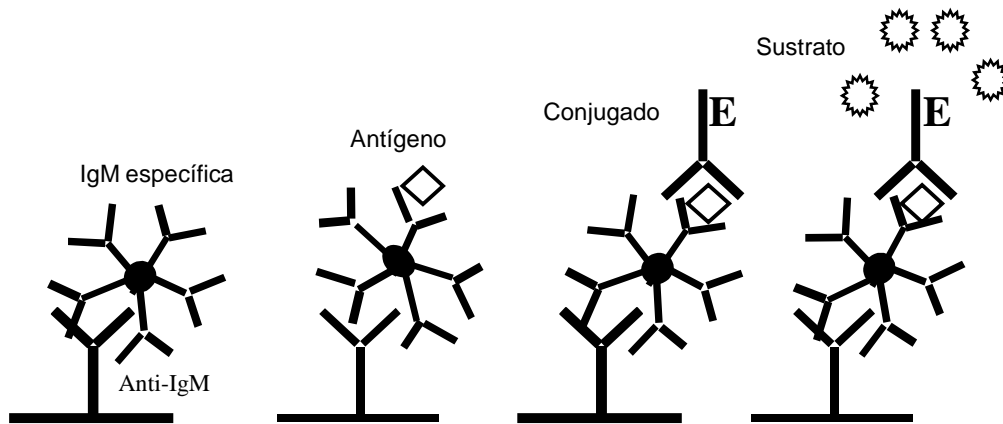
específicos, de elevada precisión y exactitud y que facilitan el estudio de un gran número de muestras (4, 5, 6).

¿Qué inmunoensayo debemos seleccionar?

Ante todo debemos precisar qué principio usar para evaluar la inmunogenicidad de una vacuna o candidato vacunal que induzca la producción de anticuerpos. Podemos seleccionar el clásico ensayo indirecto o los nuevos ensayos de doble antígeno, en los que al igual que en los indirectos, los antígenos de captura son los vacunales, pero en este caso en lugar de un conjugado antiinmunoglobulina/enzima, usamos antígeno/enzima, de esta forma se alcanza la máxima sensibilidad al no ser necesario diluir las muestras, sin embargo detectamos todas las clases de inmunoglobulinas, lo que en ocasiones no es deseable. Cuando se quiere detectar IgG, característico de la respuesta secundaria, es insustituible el ensayo indirecto con el uso de conjugados específicos de clase (2, 4, 5). Los ensayos de inhibición, aunque laboriosos, tienen la ventaja de favorecer la interacción antígeno/anticuerpo que se realiza en la fase líquida, correlacionando habitualmente bien con los ensayos *in vivo* (1, 3, 7).

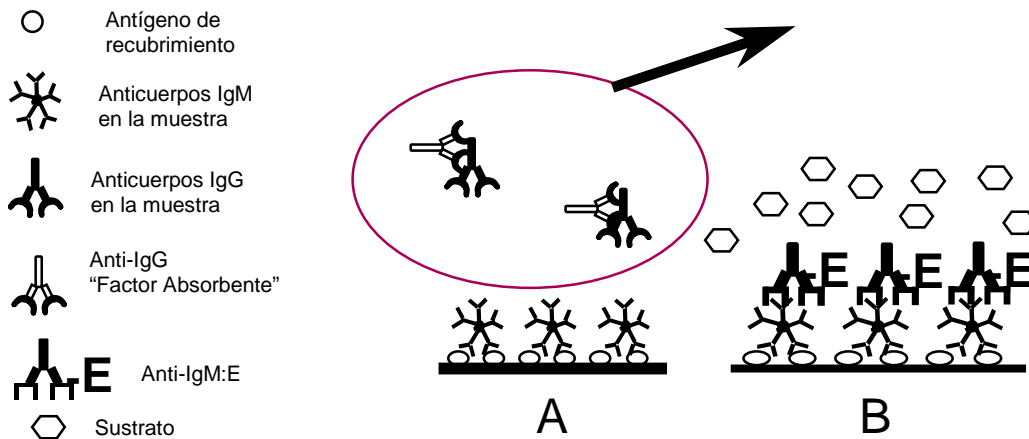
Debemos usar ensayos de captura (Figura 1) si queremos correlacionarse con ensayos *in vivo*. Dentro de las técnicas estudiar, mediante la detección de IgM, la respuesta primaria inducida por inmunógenos vacunales timo-dependientes, o la producción de IgM en los timo-independientes (4).

Figura 1. ELISA de captura para la detección de anticuerpos IgM



Puede también emplearse el ensayo indirecto, previa depleción de la IgG con antisueros anti-IgG cadena γ (Figura 2).

Figura 2. ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgM



Nota: En el paso A se añade la muestra, eliminando la IgG con el Factor Absorbente (anti-IgG cadena γ). En el B el conjugado anti-IgM detecta esta inmunoglobulina fijada al antígeno de captura.

La IgA puede ser analizada con ensayos indirectos, sobre todo en las secreciones, donde su concentración es proporcionalmente elevada.

Para detectar subclases de Inmunoglobulinas usaremos ensayos indirectos amplificados con doble conjugado; anti subclase/biotinilada y estreptavidina/enzima (4, 8).

Por último debemos precisar si el inmunoensayo debe ser cuantitativo o cualitativo. Cuando sea factible debemos optimizarlo cuantitativo, ya que de esta forma podemos reflejar la magnitud de la respuesta (9-11).

Pasos para la optimización de un ensayo:

1. Preparación de Estándares y Controles
2. Recubrimiento
3. Amortiguadores
4. Reactivos de detección
5. Condiciones de reacción

Preparación de Estándares y Controles

Este es un paso crucial, debemos garantizar la obtención de estándares y controles homogéneos para la optimización del ensayo y la ulterior evaluación de antígenos vacunales. Debe garantizarse que tengan un comportamiento paralelo a las muestras y siempre y

cuando sea posible, deben ser referenciados contra ensayos *in vivo* que midan protección. El rango seleccionado de la curva estándar debe tener un adecuado ajuste lineal (Figura 3 y 4) e incluir el valor mínimo de protección si es conocido (9).

Figura 3. Múltiples diluciones del suero estándar para seleccionar el rango óptimo.

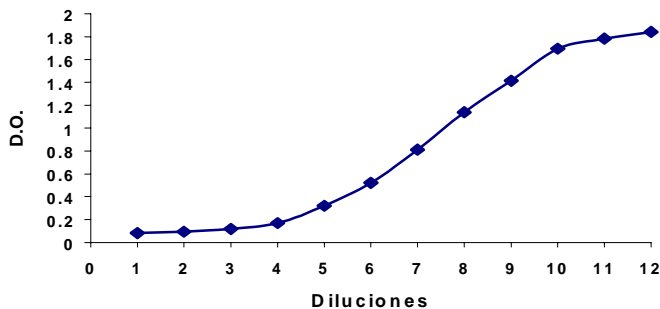


Figura 4. Diluciones seleccionadas para la confección de la Curva Estándar

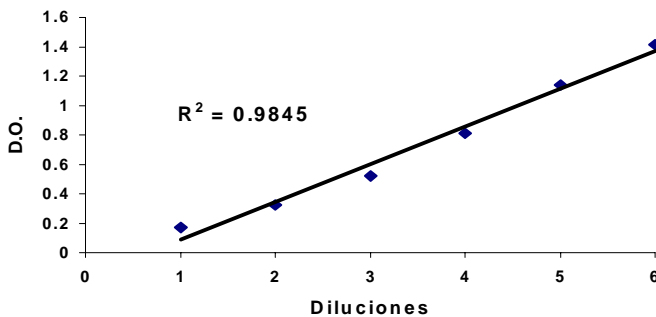
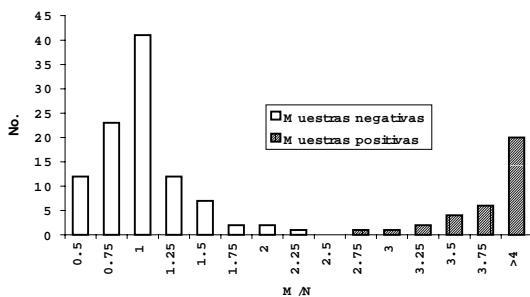


Figura 5. Distribución de frecuencias en paneles de muestras positivas y negativas, mostradas como el cociente entre las muestras y el promedio de los controles negativos (M/N).



El suero control positivo debe ubicarse en la zona central de la curva, usualmente la de mayor pendiente. Algunos autores recomiendan el uso de controles de alta, media y baja concentración, este último en la zona del valor mínimo de protección si es conocido (12). Los controles negativos son útiles fundamentalmente en el proceso de estandarización.

En el caso de los ensayos cualitativos debe determinarse el valor de corte, definido de acuerdo con nuestros intereses, teniendo en cuenta la sensibilidad y especificidad (10). Generalmente los métodos de pesquiasaje requieren la máxima sensibilidad y los confirmatorios una elevada especificidad. Para determinar el valor de corte deben usarse paneles de muestras positivas y negativas y debe siempre referirse o bien a los controles positivos o a los negativos. Recomendamos su cálculo basado en el método del valor límite (13), en el que se calcula para cada muestra el cociente muestra-control, o la diferencia muestra-control, normalizando de esta forma los valores obtenidos en diferentes corridas. El valor de corte será el que alcance la sensibilidad y especificidad deseada. En un ejemplo ideal (Figura 5), el cociente muestra / control negativo = 2,5 alcanza una sensibilidad y especificidad del 100%, de tal forma por simple despeje matemático definimos como valor de corte 2,5 veces el promedio de los controles negativos en cada ensayo particular. Toda muestra cuyo valor sea igual o superior a 2,5 será considerada por lo tanto reactiva o positiva.

Recubrimiento

Selección del soporte sólido

Debemos definir el material y su forma. Las perlas, micropartículas y membranas, generalmente brindan una mayor sensibilidad al aumentar la superficie de contacto, pero son menos apropiadas para el procesamiento de un elevado número de muestras. Las microplacas, con sus múltiples variantes, siguen siendo las de selección en los ELISA. Aunque existe un gran número de materiales; cloruro de polivinilo, polipropileno, acrílico, etc, el poliestireno es el más usado por su excelente cualidad óptica, por facilitar enlaces estables y su dureza mecánica. Si la lectura es colorimétrica usaremos materiales transparentes, si es fluorimétrica, blancos o negros. La adsorción de las biomoléculas depende principalmente de las débiles pero numerosas fuerzas de atracción intermoleculares, basados en polaridades eléctricas intramoleculares; alternativas y estacionarias, mediadas principalmente en el primer caso por grupos hidrofóbicos y en el segundo por grupos hidrofílicos. Las microplacas de poliestireno pueden ser estándares o de alta captación (Tabla 1). Estas últimas además de los grupos hidrofóbicos característicos de este material, tienen una fina red de moléculas hidrofílicas capaces de establecer puentes de hidrógeno (14, 15).

Tabla 1. Poliestireno de elección según su preferencia para la adsorción de biomoléculas

Alta captación	Estándar
Proteínas y péptidos	Proteínas y péptidos.**
Glicoproteínas	Lipoproteínas
Poliglicanos	Lípidos

* Predominio de aminoácidos hidrofílicos.

** Predominio de aminoácidos hidrofóbicos.

Hay otros poliestirenos diseñados para establecer enlaces covalentes con material biológico de difícil adsorción como carbohidratos y ácidos nucleicos (15).

a) Inmovilización de material biológico

La inmovilización del material biológico a emplear depende principalmente de:

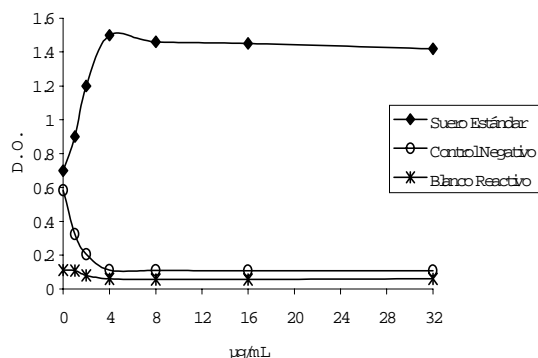
- Tipo de soporte sólido e hidrofobicidad de la biomolécula, ya analizados.

- Tamaño y concentración de la biomolécula. A menor talla y mayor concentración se incrementa la adsorción. Concentraciones entre 1–10 µg/mL son generalmente suficientes. Elevadas concentraciones pueden provocar una disminución de la sensibilidad del ensayo (efecto "gancho") por la formación de sobrecapas (14, 15).
- Tiempo y temperatura. Son directamente proporcionales a la adsorción, sin embargo, cuando se prolonga demasiado el tiempo o se aumenta excesivamente la temperatura, puede disminuir la adsorción por desnaturalización de las biomoléculas. Hay una relación inversa entre tiempo y temperatura que debe ser controlada estrechamente, incubaciones de 2-4 horas a 37 °C son equivalentes a 16–20 horas a 2–8 °C. Generalmente esta última combinación es satisfactoria, aunque el tiempo y la temperatura óptimos son particulares para cada biomolécula (14, 15). La adsorción de células puede requerir su desecado durante 16-20 horas entre 33–37 °C, preferentemente con una humedad relativa menor del 50%.
- Amortiguadores. La adsorción es más fuerte cerca del punto isoeléctrico de la biomolécula, sin embargo el amortiguador de elección se determina experimentalmente. El más común y de mejores resultados sigue siendo el amortiguador carbonato / bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Entre otros amortiguadores tenemos: tris 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 8,5; tris 0,05 M, pH 8,0; fosfato de sodio 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2; citrato 0,1 M, pH 6,0; el clásico amortiguador fosfato salino 0,15 M, pH 7,2 e incluso la propia agua desionizada puede ser el de elección (14).

Procedimiento

Se define como la concentración óptima de recubrimiento a una temperatura, tiempo y amortiguador definido, como aquella en la que el suero estándar o el control positivo alcance la mayor señal, generalmente mantenida a concentraciones superiores ("meseta") y se obtenga la menor señal para el control negativo y el blanco reactivo. En la práctica se prefiere recubrir a un ligero exceso de material biológico siempre y cuando se cumplan las condiciones anteriores. En el ejemplo (Figura 6), la concentración de elección sería sobre los 4 µg/mL.

Figura 6. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento



Si se sigue este procedimiento puede obviarse en algunas ocasiones el procedimiento de bloqueo. Cuando es necesario debe hacerse con una molécula inerte como seroalbúmina bovina (SAB), gelatina, suero fetal de ternera o de otra especie, caseína o leche descremada, sin embargo estas dos últimas deben evitarse cuando se evalúan sueros para enfermedades autoinmunes por el riesgo de auto anticuerpos anticaseína (16). Las concentraciones, tiempo y temperatura usados son muy variables. El tween 20, además de ser un detergente es un eficaz agente bloqueador, por lo que habitualmente es suficiente con los lavados usados para eliminar el exceso de reactivos en el recubrimiento (16).

Amortiguadores

Además de los usados en el recubrimiento, los amortiguadores se usan para la dilución de los inmunorreactantes y los lavados. Generalmente tienen un pH neutral y los usados como diluyente contienen moléculas con función estabilizante y bloqueadora. Se sugiere que contengan todas las moléculas que han sido usadas previamente, excepto las que queremos medir, también las correspondientes al conjugado. Por ejemplo, en un ensayo indirecto en el que hemos bloqueado con SAB y en el que usamos un conjugado de cabra anti-IgG / enzima, debemos añadir SAB y suero de cabra en el diluyente de la muestra y del conjugado. Es recomendable usar detergentes en los reactivos secundarios (16).

Ejemplos de amortiguadores:

Amortiguador fosfato salino 0,15 M, pH 7,2 – 7,4

Amortiguador tris 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,8

Amortiguador tris 0,015, M NaCl 0,15 M, pH 7,8

Dentro de los detergentes el tween-20 es el de elección al 0,05% (v/v), sobre todo cuando se usa material de alta captación.

En nuestro caso como diluyente de la muestra y el conjugado hemos usado con buenos resultados el amortiguador fosfato salino 0,15 M, pH 7,2–7,4 tween 20 0,05% con 3% (p/v) de leche descremada.

Reactivos de detección

Se han usado diferentes enzimas y en los últimos años se ha incrementado el uso de sistemas cíclicos enzimáticos de amplificación y sustratos fluorescentes y quimioluminiscentes, todos en aras de aumentar la sensibilidad de los ensayos. Las enzimas más ampliamente usadas siguen siendo la peroxidasa y la fosfatasa alcalina, con sustratos colorimétricos para el ELISA y de depósito en el caso de ensayos sobre membrana de nitrocelulosa (4).

Condiciones de reacción

En la interacción antígeno-anticuerpo participan los mismos factores que intervienen en el recubrimiento. El pH, la fuerza iónica, la temperatura y los solventes orgánicos influyen en la estabilidad del complejo antígeno / anticuerpo (17).

La formación de complejos generalmente se incrementa con la temperatura. Las más usadas son la temperatura de laboratorio (20-25 °C y 37 °C). El uso “estándar” de esta última temperatura no tiene que ser universalmente adecuado, ya que en los llamados anticuerpos “fríos” la formación de complejos puede afectarse (17), aunque la producción de estos anticuerpos no es lo esperado en respuesta a inmunógenos vacunales.

El tiempo de reacción óptimo para muestra y conjugado se determina por la mayor discriminación entre el estándar o el control positivo y el control negativo. Debe tenerse en cuenta que un excesivo tiempo de reacción puede incrementar las uniones inespecíficas, sobre todo en los ensayos indirectos, en los que ordinariamente son suficientes condiciones de reacción de 1 hora a 37 °C en los pasos de muestra y conjugado y de 30 minutos para el sustrato a 20 – 25 °C (2, 5, 6).

De forma similar se procede para determinar la concentración de trabajo (dilución) de muestras y conjugado. Cuando se requiere usar diferentes diluciones de una muestra, debe demostrarse un adecuado paralelismo y especificidad (9-11). Para definir la dilución debe tenerse en cuenta aquella en que se detecte la mayor parte de las muestras pre y post inmunización.

Conclusiones

La estandarización de un inmunoensayo es un proceso dinámico, en el que las fronteras entre este

procedimiento y el de validación no están claramente definidas (9, 10). Una buena estandarización es necesaria para obtener buenos resultados en el proceso de validación, de éste puede derivarse la necesidad incluso de la reestandarización del método.

Contar con una buena herramienta de evaluación es un requisito imprescindible para los ensayos preclínicos y clínicos de vacunas.

Referencias

1. Galazka AM. The Immunological Basis for Immunization Series. Module 3. Tetanus. World Health Organization: Geneva, 1996.
2. 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.
3. Ann NQ, Hong HA, Nhon TN, Think ND, Van NT, Hendriks J. Tetanus antibodies measured by the toxin binding inhibition test (ToBI) in mothers and children in the Neonatal Tetanus Program in Vietnam. *Dev Biol Stand* 1999;101:247-253.
4. Tijssen P. Outline of the strategies for enzyme immunoassays. In: 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, 1993:9-20.
5. Martínez JC, Ochoa R, Estrada E, Riverón L, González M, Ferriol X et al. Validación de un ELISA para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas humanas anti polisacárido capsular de *Salmonella typhi*. *VacciMonitor* 1999;8(8):7-10
6. Nerey M, Ochoa R, Martínez JC, Licea T, Ferriol X, García AM, et al. Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG humana anti-polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C. *Biotechnología Aplicada* 1999;16:113-115.
7. Rodríguez L, Balmaseda A, Bravo J, Trujillo J, Martínez L, Ochoa R et al. Validación de un ultramicroELISA de detección de anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B. *Rev Cubana Med Trop* 1996;48(1):45-49.
8. Tijssen P. Non-immunologic molecular recognition systems used in immunoassays. In: 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, 1993:21-37.
9. 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.
10. Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X, Blanco R et al. Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor* 2000;9(1):17-20.
11. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Validation of analytical assays. WHO Geneva, 1997:65-95.
12. Plikaytis B D, Carlone G M, Turner S H, Gheesling L L, Holder P F. Program ELISA user's manual. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 1993.
13. Ochoa R. A new format ELISA for the detection of HBsAg. *Biotechnología Aplicada* 1998;15:250-253.
14. Tijssen P. The immobilization of immunoreactants on solid phases. In: 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.
15. Labsystems. Studies on Immobilization of Biological Materials. Enhanced Adsorption to Modified Polystyrene. Labsystems Research Centre, Finland, 1992.
16. Esser P. Blocking Agent and Detergent in ELISA. *Nunc Bulletin* 1991 June 9:1-4.
17. Tijssen P. Kinetics and nature of antibody-antigen interactions. In: 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.

Guide for the standardization of enzyme immunoassays for use in vaccine trials

Abstract

The standardization of enzyme immunoassays, for use in evaluation of pre-clinical and clinical vaccine trials, was reviewed. A practical guide was made. The immunoassay principles and the assay optimization step – including the preparation of standards and controls – are analyzed. Our experience is presented.

Key words: Standardization, enzyme immunoassays, ELISA, vaccines.