

# Validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano

Rolando Ochoa, Juan Carlos Martínez, Esther M. Fajardo, Eduardo Alvarez, Eric Estrada, Ana Margarita García, Xenia Ferriol, 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 desarrolló un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) de tipo indirecto para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano, con el empleo de un estándar previamente calibrado. Las imprecisiones intra e interensayo fueron de alrededor del 10%. Este ensayo mostró una excelente exactitud, con valores de recuperación entre 90% y 110%. Las desviaciones del paralelismo estuvieron por debajo del 10%; éstas se evaluaron mediante diluciones que involucraban el rango de trabajo de la curva estándar. El límite de detección fue 0,0016 Unidades Internacionales por mL (UI/mL). El ensayo mostró una buena correlación con la prueba de neutralización ( $R^2=0,9862$ ). La ecuación de ajuste lineal fue:  $ELISA = 0,993 \text{ ensayo de neutralización} - 0,2143$ . Se cuantificó la antitoxina tetánica en muestras de suero de 408 niños entre 1 a 5 años de edad, aleatoriamente seleccionados en Ciudad de La Habana y cada edad se analizó por separado. La mayor respuesta se alcanzó a los 2 años de edad, al completarse el esquema básico de inmunización. Todos los niños presentaron valores superiores al nivel mínimo protector (0,01 UI/mL).

**Palabras claves:** Antitoxina tetánica, ensayo inmunoenzimático, ELISA, validación.

## Introducción

El tétanos es causado por la acción de la toxina tetánica o tetanospasmina, una potente neurotoxina que es producida durante el crecimiento del *Clostridium tetani*. Esta toxina inactivada con formaldehído se convierte en toxoide, el cual ha sido usado como vacuna monovalente en la inmunización de adultos, o como componente de las vacunas combinadas: difteria-pertussis-tétanos (DPT) o difteria-tétanos (DT) para la inmunización de niños. La vacuna combinada difteria-tétanos (dT) para adultos, contiene la cantidad normal de toxoide tetánico y una cantidad reducida de toxoide diftérico. La DPT es la matriz principal para otras vacunas combinadas y el toxoide tetánico es usado habitualmente como proteína portadora en vacunas conjugadas (1-4).

El tétanos es aún un grave problema de salud. La mortalidad mundial alcanzó en 1999 la cifra de 410 000 personas, incluyendo 215 000 casos de tétanos neonatal, y es la tercera causa de muerte entre las enfermedades inmunoprevenibles, únicamente superado por la hepatitis B y el sarampión (5).

La inmunidad contra el tétanos es inducida solamente mediante la inmunización; las personas no inmunizadas corren el riesgo de adquirirla a través de heridas contaminadas, incluyendo el muñón umbilical. La

recuperación clínica de tétanos no protege contra nuevas infecciones (1).

La antitoxina tetánica puede ser medida por técnicas *in vivo* e *in vitro*. Las pruebas de neutralización *in vivo* miden directamente la actividad biológica de la antitoxina tetánica en animales de laboratorio, generalmente ratones. Las pruebas de neutralización son sensibles y específicas, sin embargo son caras, requieren durante mucho tiempo personal altamente entrenado, un gran número de animales y relativamente gran volumen de suero para su ejecución (1, 6).

La interacción entre la antitoxina y la toxina tetánica (o toxoide) puede ser medida por diferentes ensayos *in vitro*, entre ellos la hemaglutinación pasiva, el radioinmunoensayo y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Estas técnicas son simples, sensibles, rápidas y menos caras que los métodos de neutralización *in vivo*, sin embargo son menos específicas. Por lo tanto, los resultados de las técnicas *in vitro* deben ser interpretados cuidadosamente y verificados contra los métodos de neutralización (1, 7).

Las técnicas *in vitro* para el control de la vacunación y pesquijajes seroepidemiológicos deben ser capaces de

detectar niveles mínimos protectores de antitoxina tetánica.

Como no existen estuches comerciales capaces de detectar esas concentraciones (1), nos propusimos desarrollar una técnica ELISA para la determinación cuantitativa de antitoxina tetánica como un procedimiento alternativo a los métodos *in vivo*, que permita conocer la inmunidad contra el tétanos y evaluar la respuesta al componente tetánico en vacunas combinadas que se desarrollan en nuestro país.

## Materiales y Métodos

### Antígeno

Como antígeno de captura se usó toxoide tetánico altamente purificado producido por el Instituto Finlay (La Habana, Cuba), lote No. 007-97, con 1320 unidades de floculación por mL (Lf/mL) y 0,73 mg de proteína por mL, lo cual implica una pureza de 1808 Lf/mg de nitrógeno proteico.

### Suero Estándar

Se preparó a partir de la mezcla de 10 sueros provenientes de donantes de sangre para inmunoglobulina tetánica. Este suero estándar fue cuidadosamente estudiado contra el suero local de referencia (lote ATTRN(1)/1999) mediante la prueba de neutralización en ratones (6), previamente calibrado contra el segundo estándar internacional de la OMS para antitoxina tetánica (antisuero de caballo hiperinmune con 1400 UI/ámpula) (8) y ajustado a 0,96 Unidades Internacionales por mL (UI/mL) con albúmina sérica humana al 6% (p/v). La actividad máxima de trabajo fue de 0,016 UI/mL, después de diluido con amortiguador fosfato salino 0,15 M, pH 7,2, con 0,05% (v/v) de Tween 20 (AFST) y 3% (p/v) de leche descremada (Merck, RFA).

### Procedimiento ELISA

Se sensibilizaron placas ELISA (COSTAR® Cat. N°3590, Cambridge, Ma, USA) con 100 µL de toxoide tetánico por pocillo a una concentración de 10 Lf/mL en amortiguador carbonato, bicarbonato de sodio 0,05 M, pH 9,6. El toxoide no adsorbido se eliminó lavando la placa cuatro veces con 300 µL de AFST por pocillo.

La curva de calibración se preparó con seis diluciones doble seriadas del suero estándar en AFST con 3% (p/v) de leche descremada (AFSTM). Los sueros de prueba se diluyen inicialmente 1:200 en AFSTM; si la actividad obtenida fue mayor que 3,2 UI/mL se hicieron diluciones

mayores, si la actividad fue menor de 0,1 UI/mL se diluyeron 1:20.

Se añadieron 100 µL de cada solución en duplicado a los pocillos y se incubaron las placas 1 hora a 37°C. Después de lavar como se indicó, se añadieron 100 µL de conjugado por pocillo (anti-IgG humana en cabra: fosfatasa alcalina) (Sigma A0287, St Louis, MO, USA) diluido 1:2000 en AFSTM y las placas se incubaron nuevamente 1 hora a 37°C. Después de lavar se añade en cada pocillo 100 µL del sustrato p-nitrofenil fosfato (Sigma 104® USA) a una concentración de 1 mg/mL, diluido en amortiguador dietanolamina 0.92 M, pH 9,8. Las placas se incubaron entre 20-25 °C por 30 min y las absorbancias se midieron en un lector de placas ELISA (Anthos 2001, Labtec Instruments, Austria) a 405 nm.

Los valores de absorbancia se transforman a UI/mL con un programa desarrollado por el Centro para el Control de Enfermedades, Atlanta, GA (9, 10). Se usó la función logistic-log de 4 parámetros para construir la curva de referencia. La validación y determinación cuantitativa de antitoxina tetánica se hicieron con el paquete de programas ELISA (9, 10).

### Parámetros de validación

#### a) Precisión

Se analizó con cinco sueros de altos, medios y bajos niveles de antitoxina tetánica. El coeficiente de variación (CV) se usó para expresar las variaciones. Se hicieron 10 y 3 replicados respectivamente para las pruebas intra e interensayo (11, 12).

#### b) Exactitud

La exactitud se estudió con una prueba de recuperación. Cinco muestras de suero con altos, medios y bajos niveles de antitoxina se diluyeron 1:2 con un suero negativo. El valor esperado se definió como la mitad del valor de la muestra no diluida. La exactitud se expresó como el porcentaje entre el valor obtenido y el valor esperado ( $[\text{valor obtenido} / \text{valor esperado}] \times 100\%$ ) (11, 12).

#### c) Evaluación de la curva estándar

La curva estándar se evaluó con un ensayo de paralelismo o dilución. Cinco muestras de suero que abarcaban altos, medios y bajos niveles de antitoxina se estudiaron en tres diluciones con AFSTM, cubriendo el rango de trabajo de la curva estándar. El CV entre el valor observado a estas diluciones (luego de la corrección por el factor de dilución) fue usado para evaluar el paralelismo (11, 12).

#### d) Límite de detección

Se hicieron 52 réplicas del blanco reactivo (AFSTM) y de una muestra de suero proveniente de un paciente con tétanos clínico. El promedio más dos desviaciones estándar ( $X+2DE$ ) se tomó como estimado del límite de detección.

#### e) Correspondencia entre el ELISA y la prueba de neutralización

Para establecer la correspondencia entre el ELISA y la prueba de neutralización usada como referencia, se estudiaron por ambas técnicas 29 muestras diferentes de suero. Considerando los valores obtenidos por el ensayo de neutralización como referencia (variable independiente  $x$ ), se calculó la ecuación de regresión por el método de mínimos cuadrados. Se compararon los valores medios de los valores de actividad de antitoxina tetánica de ambas distribuciones por la prueba  $t$  de Student para muestras apareadas, después que se verificó la normalidad de la distribución con la prueba Chi cuadrado (11, 12). Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa Statgraphic (13) en una computadora IBM compatible.

#### Aplicación Técnica

Asumiendo una seroprevalencia de antitoxina tetánica del 90%, 95% de confiabilidad, una precisión del 5% y un muestreo estratificado, se calculó un tamaño muestral de al menos 342 niños entre 1-5 años de edad (14). El reclutamiento se aumentó para compensar las pérdidas. Los niños se seleccionaron aleatoriamente en Ciudad de La Habana en 1998, después que los padres dieron su consentimiento por escrito. Los sueros se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento por el ELISA previamente descrito. Se calculó la media geométrica y el intervalo de confianza al 95% previa transformación logarítmica de las distribuciones de valores de actividad de antitoxina tetánica (13).

## Resultados y Discusión

La toxina tetánica, a diferencia de la diftérica, no produce un efecto dermonecrótico o citopático, por lo que no pueden usarse ensayos basados en estos principios para evaluar la actividad de la antitoxina tetánica, que puede ser medida por otros métodos *in vivo* o *in vitro* (1).

La neutralización *in vivo* es una prueba muy sensible pero engorrosa. Los métodos para la evaluación de antitoxina tetánica se basan en la propiedad neutralizante del suero sobre dosis conocidas de toxina, la cual al quedar libre se detecta en animales. Se utilizó el método basado en las proporciones de ratones que mueren y sobreviven al final de un período determinado de tiempo después de inocular la mezcla suero-toxina (1, 6).

Los métodos *in vivo* se basan en la capacidad funcional de la antitoxina para neutralizar la toxina. En contraste, algunas pruebas *in vitro* detectan no solamente los anticuerpos neutralizantes, por lo tanto las pruebas de neutralización *in vivo* deben ser usados para calibrar y verificar las pruebas *in vitro* destinados al uso rutinario (1, 7).

Entre ellas, la hemaglutinación pasiva tiene como principal desventaja su sensibilidad preferencial por la IgM, que es incapaz de neutralizar la toxina tetánica. El radioinmunoensayo tiene una alta sensibilidad, sin embargo sus reactivos y equipamiento son caros, la técnica requiere de personal altamente entrenado y el material radioactivo representa un riesgo potencial. El ELISA sin embargo, es una prueba muy útil, pues su sensibilidad es semejante al radioinmunoensayo y puede procesarse lo mismo un número pequeño como uno grande de muestras (1). Se desarrolló por tanto un ELISA indirecto que usa el toxoide tetánico como antígeno de captura.

Las variaciones intra e interensayo que reflejan la precisión de este ELISA se muestran en las Tablas 1 y 2. El ensayo es reproducible con CV alrededor del 10%.

Tabla 1. Precisión intraensayo del ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica

Muestras n = 10	Placa N°1		Placa N°2		Placa N°3	
	X (UI/mL)	CV (%)	X (UI/mL)	CV (%)	X (UI/mL)	CV (%)
1	3,796	12,50	3,754	7,70	3,811	6,80
2	1,641	9,79	1,715	8,73	1,795	11,08
3	0,587	9,37	0,620	8,10	0,610	5,69
4	0,224	8,44	0,234	5,95	0,228	5,51
5	0,016	8,51	0,017	8,91	0,015	8,21

X = Promedio.

CV = Coeficiente de variación.

**Tabla 2. Precisión interensayo (n=3) del ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica**

Muestras	X (UI/mL)	DE (UI/mL)	CV (%)
1	3,787	0,0295	0,78
2	1,717	0,0771	4,49
3	0,606	0,0172	2,84
4	0,228	0,0054	2,35
5	0,016	0,0008	5,27

X = Promedio.

DE = Desviación estándar.

CV = Coeficiente de variación.

La inexactitud de una prueba brinda información sobre errores sistemáticos (11, 12). El ensayo de recuperación diseñado para determinar la capacidad del ensayo para medir el valor esperado demostró una exactitud excelente (Tabla 3).

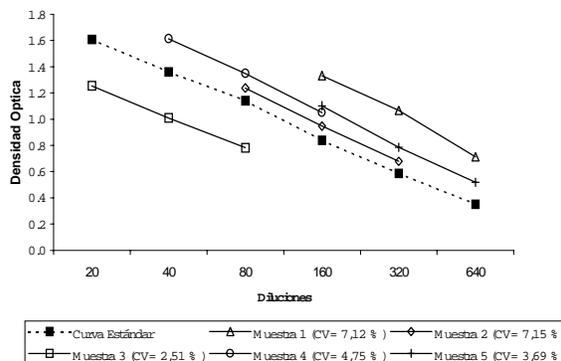
**Tabla 3. Exactitud del ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica**

Muestras	Valor Esperado (UI/mL)	Valor Obtenido (UI/mL)	Recuperación (%)
1	2,239	2,106	94,06
2	1,642	1,626	99,03
3	0,467	0,454	97,22
4	0,356	0,368	103,37
5	0,248	0,256	103,23

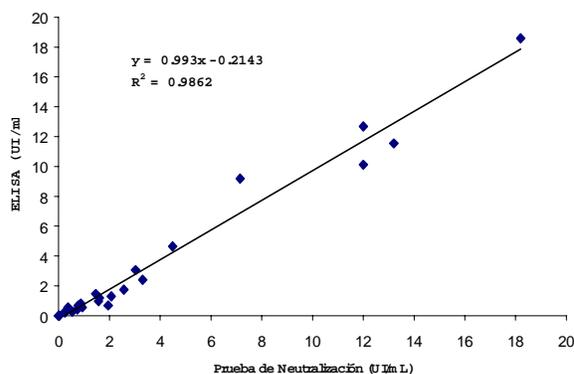
Para que los resultados de cualquier método analítico sean válidos, es esencial que el analito en el suero estándar y en las muestras presenten un comportamiento similar, por esta razón la dilución de las muestras normalmente no debe afectar el resultado final. Las muestras estudiadas con tres diluciones mostraron, una vez corregidas con el factor respectivo, tan sólo pequeñas desviaciones del valor observado ( $CV < 10\%$ ), que no afectaron el paralelismo con la curva estándar (Figura 1).

Una buena correspondencia ( $p=0,136$ ) se encontró entre nuestro ELISA y la prueba de neutralización. La ecuación de ajuste lineal fue:  $ELISA = 0,993 \text{ Prueba de Neutralización} - 0,2143$ , con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9862 (Figura 2).

**Figura 1. Ensayo de dilución del ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica**



**Figura 2. Análisis de regresión lineal entre los valores de actividad de antitoxina tetánica obtenidos por el ELISA y la prueba de neutralización en 29 muestras de suero**



Por otra parte, no ha sido reportada una buena correlación entre el ELISA indirecto, otras pruebas in vitro y las de neutralización in vivo, ya que las primeras tienden a sobrestimar los sueros de bajos títulos (1, 7, 15), probablemente esto se deba a la presencia de anticuerpos inespecíficos o de baja afinidad; por ello se han desarrollado ELISAs de inhibición de antígeno (1, 16, 17). El fundamento teórico de esta prueba se basa en que la unión entre la antitoxina y el antígeno se favorece cuando éste está en solución, sin embargo estos ELISAs son más complicados, sobre todo cuando se requiere procesar un gran número de muestras. La buena correlación obtenida por nuestro ELISA, aún a bajos niveles, puede deberse a la optimización del ensayo con una curva estándar de alta sensibilidad, la concentración de leche descremada usada en el amortiguador diluyente

de muestras y conjugado como agente bloqueador y estabilizante y la elevada pureza del toxoide tetánico empleado como antígeno de captura.

Con este ELISA pueden medirse diferentes niveles de antitoxina tetánica, entre 0,01 y 0,32 UI/mL diluyendo la muestra 1:20; de 0,1 a 3,2 UI/mL con una dilución 1:200 y si se requiere cuantificar niveles superiores pueden hacerse mayores diluciones. Es esencial tener un inmunoensayo con un amplio rango para la cuantificación de antitoxina tetánica y un bajo límite de detección para la evaluación de la respuesta inmune inducida por el toxoide tetánico. El límite de detección, calculado con el blanco reactivo fue 0,0016 UI/mL. Cuando se analizó una muestra de suero de un paciente con tétanos clínico, su actividad promedio fue de 0,012 UI/mL y el límite de detección se elevó a 0,015 UI/mL, sin embargo no estamos seguros si este suero tenía algunos niveles de

antitoxina tetánica ya que no pudo ser estudiado por la prueba de neutralización *in vivo* debido al escaso volumen de muestra. Se considera que 0,01 UI/mL de antitoxina circulante es el nivel mínimo protector, sin embargo hay reportes de tétanos en personas con niveles de antitoxina superiores (1, 18).

La Tabla 4 muestra los detalles de la respuesta de antitoxina tetánica en los 408 niños reclutados. En todos los grupos se detectó una inmunidad excelente, similar a la observada en países desarrollados (19, 20), lo que demuestra la calidad de nuestro Sistema Nacional de Inmunización. La respuesta máxima se alcanzó a los 2 años, al culminar el esquema básico de cuatro dosis. Todos los niños presentaron valores superiores que el nivel mínimo protector (0,01 UI/mL).

**Tabla 4. Valores medios geométricos de actividad de antitoxina tetánica e intervalos de confianza al 95% determinados por ELISA en 408 niños de Ciudad de La Habana, 1998**

Edad en años	No.	VMG	IC 95 %
1	73	2,403	1,853 – 3,117
2	85	3,253	2,734 – 3,870
3	77	1,337	1,081 – 1,653
4	98	0,925	0,798 – 1,073
5	75	1,178	0,855 – 1,621
Total	408	1,598	1,433 – 1,782

VMG = Valores medios geométricos

IC 95% = Intervalos de confianza al 95%

El ELISA descrito para la determinación cuantitativa de antitoxina tetánica es una herramienta valiosa para determinar la protección contra el tétanos y puede ser especialmente útil en estudios

seroepidemiológicos y para la evaluación de la respuesta inmune inducida por el toxoide tetánico, en vacunas monovalentes o combinadas.

## Referencias

- Galazka AM. *Tetanus*. En: The Immunological Basis for Immunization Series. Geneva: World Health Organization; 1996.
- Hoppenbrouwers K, Roelants M, Ethevenaux C, Vandermeulen C, Knops J, Desmyter J. The effect of reconstitution of an *Haemophilus influenzae* type b tetanus toxoid conjugate (PRP-T) vaccine on the immune responses to a diphtheria-tetanus-whole cell pertussis (DTwP) vaccine: a five-year follow up. *Vaccine*. 1999;17:2588-98.
- Halperin SA, King J, Law B, Mills E, Willems P. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae*-tetanus toxoid conjugate vaccine given separately or in combination with a three-component acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids and inactivated poliovirus vaccine for the first four doses. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 28:995-1001.
- Pichichero ME, Latiolais T, Bernstein DI, Hosbach P, Christian E, Vidor E, *et al*. Vaccine antigen interactions after a combination diphtheria-tetanus toxoid acellular pertussis / purified capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b tetanus toxoid vaccine in two, four and six month old infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1997;16:863-70.
- Zaffran M. Immunize every child: GAVI strategy for sustainable immunization services. En: *GAVI Global Alliance for Vaccines and Immunization*. Second Board Meeting; Switzerland: Davos; 2000:9-44.
- Peel MM. Measurement of tetanus antitoxin: II, toxin

- neutralization. *J. Biol. Stand.* 1980;8:191-207.
7. Winsnes R, Hendriksen C, Sesardic D, Akkermans A, Daas A. Serological assays as alternatives to the Ph Eur challenge test for batch release of tetanus vaccines for human use. *Dev Biol Stand.* 1999; 101:277-88.
  8. World Health Organization. *Biological Substances. International Standards and Reference Reagents.* Geneva; 1991.
  9. Plikaytis BD, Carlone GM, Turner SH, Gheesling LL, Holder PF. *Program ELISA user's manual.* Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1993.
  10. Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1991;29:1439-1446.
  11. 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.
  12. 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.
  13. STATGRAPHICS Plus for WINDOWS [computer program]. Version 1.0. Statistical Graphics Corp, USA, 1994.
  14. Lwanga SK, Lemeshow S. Determinación del tamaño de las muestras en los estudios sanitarios. Manual Práctico.. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1991.
  15. Dokmetjian J, Della Valle C, Lavigne V, De Lujan CM, Manghi MA. A possible explanation for the discrepancy between ELISA and neutralizing antibodies to tetanus toxin.. *Vaccine.* 2000; 18:2698-2703.
  16. 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;101:247-53.
  17. Hong HA, Ke NT, Nhon TN, Think ND, Van der Gun JW, Hendriks JT, *et al.* Validation of the combined toxin-binding inhibition test for determination of neutralizing antibodies against tetanus and diphtheria toxins in a vaccine field study in Viet Nam. *Bull World Health Organ.* 1996; 74(3):275-82.
  18. Pryor T, Onarecker C, Coniglione T. Elevated antitoxin titers in a man with generalized tetanus. *J. Fam. Pract.* 1997; 44(3):299-303.
  19. De Melker HE, van der Hof S, Berbers GA, Nagelberke NJ, Rumke HC, Lony-van Spaendonck MA. A population-based study on tetanus antitoxin levels in the Netherlands. *Vaccine.* 1999;18:100-8.
  20. Takahashi M, Komiya T, Fukuda T, Nagaoka Y, Ishii R, Goshima F, *et al.* A comparison of young and aged populations for the diphtheria and tetanus antitoxin titers in Japan. *Jpn J. Med. Sci. Biol.* 1997;50(2):87-95.

## Validation of an ELISA for the quantitative determination of tetanus antitoxin in human serum

### Abstract

An indirect solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for the quantitation of tetanus antitoxin in human serum on the basis of a previously calibrated standard. Intra and inter-assay imprecision ranged around 10%. This assay showed an excellent accuracy with recovery values between 90% and 110%. Parallelism deviations were below 10%. They were evaluated by dilutions that covered the working range of the standard curve. The detection limit was 0.0016 International Units per mL (IU/mL). A good correlation was found between the ELISA and the neutralization test ( $R^2 = 0,9862$ ). The fitting linear equation was: ELISA = 0,993; neutralization test – 0,2143. Tetanus antitoxin was quantified in serum samples from 408 children, 1-5 year-olds, randomly selected in Havana City. Each age was separately analyzed. The maximum response was reached at 2 years, after finishing the basic scheme of immunization. All children showed antitoxin values higher than the minimum protective level (0,01 IU/mL).

**Key words:** tetanus antitoxin, enzyme immunoassay, ELISA, validation.