

Validación y aplicación de un ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG contra polisacárido capsular Vi de *Salmonella Typhi*

Carlos Espinosa-Viñals,* Yamilka Soroa-Millán, Yanet Martín-García, Amarilis Pérez-Baños, Milagros Nicot-Valenciano, Laura Rodríguez-Noda, Aylín Gómez-Amador, Ubel Ramírez-González, Jean Pierre Soubal-Mora, Dagmar García-Rivera

Centro de Química Biomolecular. Calle 200 y 21, Atabey, Playa, La Habana, Cuba. P.O. Box 16042, C.P. 11600.

email: carlos.espinosa@cqb.cu

Como parte de las etapas de investigación y desarrollo de un candidato vacunal conjugado contra *Salmonella Typhi*, se desarrolló un ELISA indirecto para la cuantificación de anticuerpos IgG contra el polisacárido Vi de esta bacteria. En este trabajo se presentan los resultados del proceso de validación, en el que se determinaron el intervalo y linealidad de la curva, la precisión intra e interensayo, la exactitud, la especificidad, el límite de detección y la robustez. La curva de calibración, generada con un suero estándar interno, presentó un buen ajuste a una función polinómica y un intervalo entre las diluciones 1/100 y 1/3200. Los coeficientes de variación en los ensayos de precisión y robustez y los porcentajes de recobrado estuvieron en los intervalos establecidos para cada uno ($\leq 10\%$, $\leq 20\%$ y 90-110% respectivamente). El ensayo presentó una especificidad óptima, obteniéndose señales de DO superiores a 1,3 para sueros positivos contra Vi y bajas para sueros contra antígenos no relacionados. Los resultados avalan el empleo de este ELISA cuantitativo en ensayos de inmunogenicidad para la liberación de lotes de conjugados de Vi. Igualmente, sustentan su uso para la evaluación de la inmunogenicidad de formulaciones de polisacárido Vi y conjugados de polisacárido Vi a proteínas en fases de investigación y desarrollo.

Palabras clave: ELISA, *Salmonella Typhi*, polisacárido Vi, validación, cuantificación.

Introducción

Salmonella Typhi (*S. Typhi*) es un importante patógeno humano que representa un serio problema de salud a nivel mundial. Es una bacteria bacilar Gram negativa de flagelación peritrica, agrupada dentro de la especie *Salmonella enterica* (1). *S. Typhi* es el agente causal de la fiebre tifoidea, enfermedad severa generalizada que afecta al sistema retículo endotelial, tejidos linfoides intestinales y vesícula biliar, entre otros órganos (1).

Las estadísticas indican que, en un año, entre 17 y 22 millones de personas padecen la enfermedad y de ellas, 200 mil casos terminan fatalmente en la muerte (2-4). Los seres humanos representan su único reservorio, en los que pueden desencadenar la enfermedad o permanecer de forma asintomática.

La aparición de cepas multirresistentes a antibióticos constituye un tema preocupante en varias regiones del planeta. Actualmente los pocos antibióticos que se

emplean contra *S. Typhi* son muy caros y no se encuentran disponibles en las zonas rurales donde la enfermedad es endémica y generalizada (3, 4).

El polisacárido capsular Vi (PsC Vi) es el principal factor de patogenicidad de *S. Typhi* (2). Este polímero lineal protege a la bacteria de la actividad bactericida y la opsonofagocitosis mediada por la ruta alternativa del sistema complemento y es uno de sus determinantes antigénicos más importantes (2). Se conoce que la administración de PsC Vi confiere protección en un moderado porcentaje de las poblaciones vacunadas (2). Sin embargo, como ocurre en otras vacunas polisacáridicas, desarrollan una inmunogenicidad pobre en adultos mayores e infantes y no producen memoria inmunológica (3-9).

Estas limitaciones de las vacunas de polisacárido pueden superarse por medio de la conjugación del polisacárido a una proteína portadora, donde se convierte la respuesta tímica independiente en

*Licenciado en Microbiología. Especialista III Investigación, Innovación y Desarrollo.

dependiente de células T. La respuesta timo-dependiente se caracteriza por generar memoria, producir cambios de clase de las inmunoglobulinas y maduración de la afinidad (2, 8).

El Centro de Química Biomolecular, en colaboración con el Instituto Finlay, tiene una línea de investigación para el desarrollo de un candidato vacunal de PsC Vi conjugado a la proteína portadora toxoide diftérico (TD).

Como parte de la fase de investigación de la molécula conjugada, se requiere de un sistema analítico que posibilite evaluar la inmunogenicidad del conjugado. Con esta finalidad se desarrolló un ELISA indirecto para la evaluación de la respuesta inmune que se induce en ratones por la inmunización de diferentes conjugados de PsC Vi a TD (Vi-TD).

En este trabajo se presentan los resultados del proceso de validación de un ELISA cuantitativo para determinar la concentración de inmunoglobulina G en sueros de ratones inmunizados con conjugados Vi-TD, con el objetivo de utilizarse en la evaluación de la respuesta humoral inducida por formulaciones de conjugados de PsC Vi en ensayos de inmunogenicidad.

Materiales y Métodos

Procedimiento del ELISA de cuantificación

La cuantificación de IgG se realizó mediante un ELISA indirecto. Las placas de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano (Maxisorp, NUNC) se pre-recubrieron con una dilución de poli D-Lisina (SIGMA) 2 µg/mL y se incubaron a 4 °C durante 3 h. Las placas se lavaron con disolución de lavado (disolución tamponadora de fosfato y Tween 20, 0,05%) y se recubrieron con polisacárido Vi 10 µg/mL en disolución tamponadora de fosfatos (PBS).

Las placas se incubaron a 37 °C en cámara húmeda durante toda la noche. Los sitios no recubiertos se bloquearon con una disolución de albúmina de suero bovino (BSA al 1% en PBS) durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda.

Se adicionaron los sueros previamente diluidos 1/100 y se realizaron siete diluciones seriadas en base 2. Luego de un período de incubación de 90 min, se adicionó una inmunoglobulina monoclonal anti-IgG de ratón

conjugada a peroxidasa (SIGMA) a la dilución de trabajo (1/10 000) y se incubó a temperatura ambiente.

Se aplicó el sustrato de la enzima peroxidasa (o-fenilendiamina 0,5 mg/mL y peróxido de hidrógeno 0,0005% V-V en tampón citrato pH=5,0) y se incubó a temperatura ambiente protegido de la luz por 20 min. La reacción se detuvo con una solución de ácido clorhídrico 3 M. Finalmente se determinó la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Tecan).

Preparación del suero estándar interno

Se generó un suero estándar interno a partir de sueros positivos contra polisacárido Vi. Estos sueros se obtuvieron de ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea con Vi-TD. Los animales se inmunizaron con tres dosis de 2,5 µg sin adyuvación con intervalos de 14 días. Se extrajo la sangre por el plexo retroorbital el día 35 del esquema.

El suero se obtuvo por centrifugación luego de una incubación a 37 °C por 1 h para favorecer la formación del coágulo. Los sueros se evaluaron mediante el ELISA descrito anteriormente. Luego se seleccionaron los sueros de animales con respuestas superiores a 1,2 de densidad óptica y se mezclaron. Posteriormente se clarificó mediante un filtro de 0,2 µm y se distribuyó en alícuotas de 100 µL en microtubos de 1,5 mL y se almacenaron a -20 °C.

Caracterización de la curva de calibración

El intervalo de la curva se determinó mediante la evaluación con 16 réplicas del suero estándar interno en tres días diferentes (48 réplicas en total), con el objetivo de una mayor caracterización del comportamiento típico de la curva. Se realizaron diluciones seriadas en base 2 a partir de 1/100 hasta 1/25600.

Se analizaron el coeficiente de determinación (R^2) y los parámetros de la ecuación obtenidos. El ajuste se determinó mediante un análisis de regresión polinómica. Se seleccionó el intervalo de la curva en el cual se cumpliera que R^2 es superior a 0,98.

El suero estándar interno recibió una asignación arbitraria de 100 unidades por mililitro (UA/mL) para su empleo como curva de calibración. La linealidad del ELISA se evaluó por un ensayo de recuperación, se utilizaron pares de muestras de altas y bajas

concentraciones. Se seleccionaron 6 sueros de diferentes concentraciones de anticuerpos contra PsC Vi y se confeccionaron 3 pares de sueros a partir de uno de baja y otro de alta concentración. Cada par de sueros y su mezcla se evaluaron en una misma placa de ELISA. Se calculó la concentración de la mezcla (valor obtenido) y el promedio de las concentraciones de los sueros (valor esperado) (10, 11). El porcentaje de recuperación se definió como el cociente del valor esperado y el valor obtenido multiplicado por 100. Se consideró adecuado un porcentaje de recuperación entre un 90 y un 110% (10).

Precisión intraensayo

La variabilidad intrínseca del ELISA se determinó mediante la precisión intraensayo. Se seleccionaron cuatro sueros de diferentes concentraciones y se evaluaron por quintuplicado en siete diluciones seriadas. Se determinaron el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) (12, 13). Este último parámetro estadístico no debía superar el 10% para considerar la precisión intraensayo como óptima (14).

Precisión interensayo

Para su determinación se seleccionaron tres sueros de diferentes concentraciones y se evaluaron por triplicado en siete diluciones seriadas. La precisión interensayo se evaluó bajo tres condiciones diferentes: tres analistas un mismo día, un mismo analista mediante ensayos en paralelo y en días diferentes. El criterio de aceptación fue, que el CV no superara el 20% (14).

Exactitud

La exactitud se determinó mediante ensayos de recobrado. Se seleccionaron cuatro sueros de diferentes concentraciones y cada suero, que se nombró concentración A, se diluyó a partes iguales con un suero negativo contra PsC Vi (concentración B). Se cuantificaron las concentraciones del suero sin diluir y diluido. Cada suero se evaluó por triplicado con cuatro diluciones seriadas en base 2.

El porcentaje de recobrado (PRcb) se calculó por la fórmula $PRcb=100*A/B$. Se tomó como criterio de aceptación que el PRcb estuviera dentro del intervalo $100\% \pm 10$ (15).

Especificidad

Para la determinación de la especificidad del ELISA de cuantificación se evaluaron sueros de ratones inmunizados con diferentes inmunógenos polisacáridicos. Se incluyó además una mezcla de sueros de ratones inmunizados con PsC Vi como muestra francamente positiva.

Robustez

Se tuvieron en cuenta tres condiciones experimentales para determinar la robustez del ensayo: el tiempo de incubación de los sueros (60 y 90 min), el tiempo de incubación del sustrato (15, 20 y 30 min) y la temperatura de recubrimiento (temperatura de laboratorio (TA) y las condiciones de recubrimiento referidas anteriormente). Se evaluaron tres sueros de concentraciones diferentes bajo las condiciones experimentales que se mencionaron. Se calcularon los CV, los cuales debían ser inferiores al 20%.

Aplicación del ELISA en ensayos de inmunogenicidad de PsC Vi conjugado

Para evaluar la aplicabilidad del ELISA, se determinaron las concentraciones de sueros de animales procedentes de ensayos de inmunogenicidad. Se formaron tres grupos de experimentación, se utilizaron ratones BALB/c a los que se les administraron formulaciones de polisacárido conjugado (2,5 µg respecto al polisacárido), polisacárido no conjugado (2,5 µg) y placebo (PBS). Todos los animales recibieron dos dosis por vía subcutánea a intervalos de 14 días. La sangre se extrajo el día 28 por el plexo retro-orbital. El suero se obtuvo por el método que se describió con anterioridad y se almacenó en refrigeración hasta su uso.

Se evaluó la respuesta inmune que generó la administración de dos lotes de PsC Vi conjugado a TD como proteína portadora (lotes 1303 y 1304). El mantenimiento de los animales y los procedimientos de experimentación se realizaron de acuerdo a las normas establecidas para el trabajo con animales de laboratorio y los procedimientos institucionales aprobados.

Análisis estadístico

Las concentraciones de anticuerpos IgG contra PsC Vi se determinaron mediante el programa computacional *ELISA for Windows*, del Centro para Enfermedades

Infecciosas, desarrollado por Plikaytis y Carlone, 2005 (11). Se empleó una función logistic-log de cuatro parámetros y el método robusto de mínimos cuadrados para el ajuste de la curva de calibración.

El método de compromiso de Marquardt se utilizó como algoritmo de estimación. La desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (CV), los porcentajes de recuperación, de recobrado y el coeficiente de determinación (R^2) se calcularon mediante el paquete *Microsoft Office Excel* 2007.

Los gráficos y tablas se construyeron en este mismo programa. La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se empleó para la comparación estadística de los tratamientos experimentales, con un nivel de significación del 95%. De existir diferencias, se aplicó la prueba no paramétrica de Dunnett de comparación múltiple del programa *GraphPad Prism* 4.0.

Resultados

Caracterización de la curva de calibración

A partir de los resultados de la densidad óptica que se obtuvieron en días diferentes, se analizó el ajuste de los valores de absorbancia con los del intervalo de diluciones estudiado mediante una regresión polinómica. En la Figura 1 se observa el intervalo de la curva que presentó un mejor ajuste. En la misma se muestra igualmente la ecuación de la curva y el R^2 .

Como puede observarse, el intervalo que se seleccionó abarca valores de DO desde 0,2 hasta superiores a 1,2. De igual forma el ajuste de cada repetición se corroboró mediante el programa *ELISA for Windows*.

La linealidad se determinó mediante un ensayo de recuperación. En la Tabla 1 se presentan las concentraciones en UA/mL de los sueros de cada par, la concentración de la mezcla de ambos sueros y el porcentaje de recuperación calculado. En todos los casos, los porcentajes de recuperación estuvieron entre 90 y 99%.

Precisión

Los resultados de la precisión intraensayo se presentan en la Tabla 2. En todos los casos, se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 10%. La precisión interensayo se determinó bajo las condiciones siguientes: en un mismo día por un mismo analista y por analistas diferentes y en tres días por un mismo analista.

En la Tabla 3 se muestran las concentraciones de los sueros que se evaluaron por diferentes analistas, el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación calculado.

Las Tablas 4 y 5 muestran los resultados de los ensayos de precisión que realizó un mismo analista, un mismo día y en días diferentes respectivamente. Todos los CV fueron inferiores al 11%.

Tabla 1. Linealidad.

Par	Muestra A	Muestra B	Muestra A+B	VE	VO	PR
1	115,549	35,169	76,385	75,359	76,385	98,657
2	129,307	12,280	78,811	70,794	78,811	89,827
3	102,433	76,953	93,121	89,693	93,121	96,319
4	111,409	34,047	74,641	72,728	74,641	97,437
5	110,408	38,069	80,685	74,239	80,685	92,010
6	86,434	23,471	59,719	54,953	59,719	92,018

Se muestran las concentraciones (UA/mL) de los sueros (Muestra A y Muestra B) de los pares de muestras confeccionados para este ensayo. VE: valor esperado, es la concentración teórica de la mezcla de un par de sueros. VO: valor obtenido, corresponde a la concentración de la mezcla de un par de sueros de alta (Muestra A) y baja concentraciones (Muestra B). PR: porcentaje de recuperación.

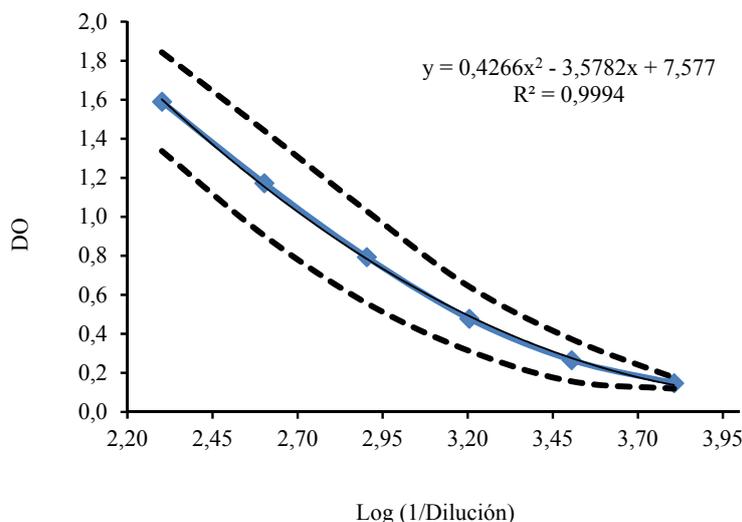


Fig. 1. Curva de calibración del ELISA de cuantificación de anticuerpos anti-polisacárido Vi. Se grafica la densidad óptica (DO) contra el logaritmo del inverso de la dilución del intervalo seleccionado. El valor promedio de las determinaciones de la curva realizadas en días diferentes se muestra en línea continua. Las líneas discontinuas representan el valor promedio \pm 2DE. DE: Desviación estándar.

Tabla 2. Precisión intraensayo.

Muestras	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5	Promedio	Desv Est	CV (%)
1	165,378	172,442	166,399	166,483	174,733	169,087	4,210	2,490
2	101,523	101,885	94,862	99,354	101,401	99,805	2,935	2,941
3	42,431	42,248	43,212	45,465	45,465	43,764	1,594	3,643
4	37,199	36,926	36,234	38,488	34,550	36,679	1,443	3,935

Se tabulan las concentraciones (UA/mL) calculadas por quintuplicado de cuatro sueros y el promedio, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

Tabla 3. Precisión interensayo por analista.

Muestras	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Promedio	DE	CV (%)
Suero 1	80,970	89,880	78,300	83,050	6,064	7,301
Suero 2	33,660	33,490	30,970	32,707	1,506	4,606
Suero 3	29,550	30,100	24,610	28,087	3,023	10,765

Determinaciones de la concentración (UA/mL) de tres sueros de ratones positivos a anticuerpos contra Vi realizadas por tres analistas en un mismo día. Se muestran el promedio, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

Tabla 4. Precisión interensayo por placa.

Muestras	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Promedio	DE	CV (%)
Suero 1	29,550	29,900	25,310	28,253	2,555	9,043
Suero 2	33,660	34,240	31,700	33,200	1,331	4,009
Suero 3	80,970	78,050	71,820	76,947	4,674	6,074

Concentraciones (UA/mL) de IgG contra Vi en tres sueros determinadas por un mismo analista un mismo día. DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación.

Tabla 5. Precisión interensayo realizada por un mismo analista en días diferentes.

Muestras	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	DE	CV (%)
Suero 1	94,541	105,087	101,812	100,480	5,398	5,372
Suero 2	42,471	37,848	41,448	40,589	2,428	5,983
Suero 3	26,939	28,077	26,920	27,312	0,663	2,426

Se muestran el promedio de las concentraciones (UA/mL), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV) calculados para las concentraciones de los tres sueros evaluados.

Exactitud

En la Tabla 6 se presentan los resultados del ensayo de recobrado que se realizó para determinar la precisión del ELISA. Los valores que se obtienen del porcentaje de recobrado se encuentran en el intervalo 90-110% para los 4 sueros evaluados.

Tabla 6. Exactitud. Porcentajes de recobrado (PRcb) calculados para 4 sueros positivos contra polisacárido Vi.

	A	A+SN	VE	VO	PRcb
1	42,890	22,840	21,445	22,840	106,505
2	30,340	15,190	15,170	15,190	100,132
3	27,730	14,690	13,865	14,680	105,878
4	40,910	19,910	20,455	19,910	97,336

Las concentraciones de anticuerpos se refieren en UA/mL. VE: Valor esperado. VO: Valor obtenido. A: Suero problema. A+SN: Suero problema diluido en suero negativo.

Especificidad

Para la determinación de la especificidad del ELISA, se evaluaron sueros de ratones inmunizados con polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C (sueros 1-8), polisacárido 14 (PsC 14) de *Streptococcus pneumoniae* (suero 9), PsC 18C (suero 10), PsC 19F (suero 11), PsC 23F (suero 12), PsC 1 (sueros 13-20) y PsC 5 (Sueros 21-28). También se incluyó una mezcla de sueros de animales inmunizados con conjugado Vi-TD. En la Figura 2 se observan los valores de las densidades ópticas de los sueros que se evaluaron. Como se puede corroborar, los 28 sueros presentaron respuestas bajas (inferiores a 0,1 en todos los casos). La absorbancia de la mezcla de sueros positivos contra PsC Vi fue muy superior a la de los otros sueros.

Robustez

Un ensayo inmunoenzimático debe dar resultados semejantes, aun cuando se empleen condiciones experimentales variadas. En nuestro caso, las condiciones que se estudiaron fueron el tiempo de incubación de los sueros, el tiempo de incubación del sustrato y la temperatura de recubrimiento.

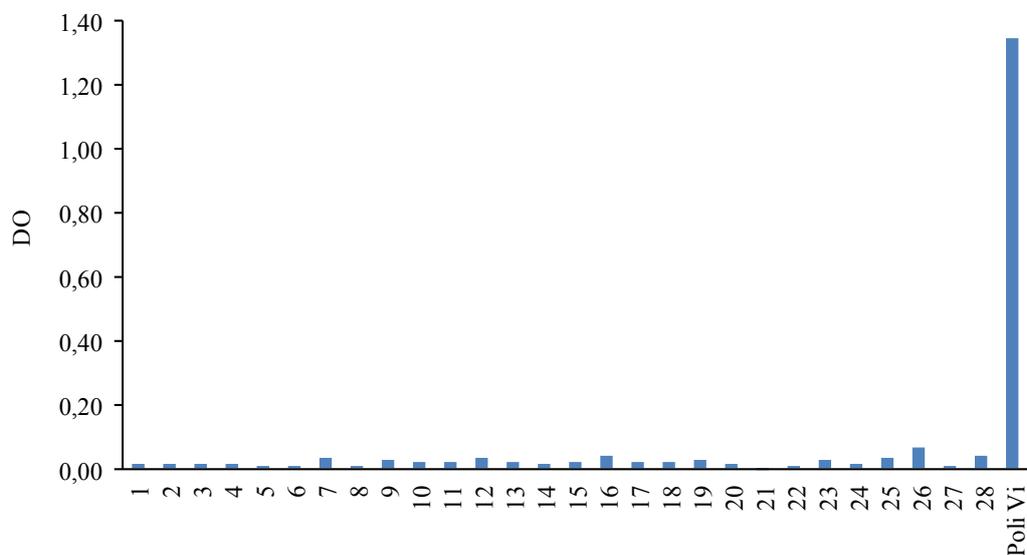


Fig. 2. Especificidad. Se observan las densidades ópticas de un suero positivo contra poli Vi y 28 sueros de ratones inmunizados con polisacárido capsular de *N. meningitidis* C (1-8) y PsC 14 (suero 9), PsC 18C (suero 10), PsC 19F (suero 11), PsC 23F (suero 12), PsC 1 (sueros 13-20) y PsC 5 de *S. pneumoniae* (sueros 21-28). DO: Densidad óptica.

Tabla 7. Robustez. Tiempo de incubación de sueros.

Muestras	60 min	90 min	Promedio	DE	CV (%)
Suero 1	46,664	41,445	44,056	3,688	8,372
Suero 2	28,541	26,920	27,731	1,146	4,133
Suero 3	93,841	88,590	91,216	3,713	4,071

Se presentan el promedio de las concentraciones (UA/mL), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV) de las concentraciones de tres sueros incubados durante 60 y 90 min. Se prefijó una $p > 0,05$.

Tabla 8. Robustez. Tiempo de incubación del sustrato.

Muestras	15 min	20 min	30 min	Promedio	DE	CV (%)
Suero 1	53,579	47,104	41,384	47,356	6,101	12,884
Suero 2	25,412	27,269	27,343	26,675	1,094	4,102
Suero 3	104,909	98,647	91,597	98,384	6,660	6,769

DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación. Se prefijó una $p > 0,05$.

En la Tabla 7 se presentan los resultados del ensayo de tiempo de incubación de los sueros. Para los tres sueros evaluados, el CV fue inferior al 9%. Los resultados de

las concentraciones a 15, 20 y 30 min de incubación con el sustrato de los tres sueros evaluados se muestran en la Tabla 8, en todos los casos, los CV fueron inferiores al 13%.

La temperatura de recubrimiento fue otra condición que se evaluó. Los resultados de este ensayo se encuentran en la Tabla 9.

Los CV calculados para las determinaciones de tres sueros bajo las dos condiciones de recubrimiento que se evaluaron fueron inferiores al 12%.

En sentido general, los CV calculados bajo las tres condiciones estudiadas estuvieron por debajo del límite a considerar como criterio de aceptación ($\leq 20\%$).

El método estadístico que se empleó no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

Aplicación del ELISA validado en ensayos de inmunogenicidad

Los sueros de los ensayos de inmunogenicidad de dos conjugados de PsC Vi a TD como proteína portadora se evaluaron mediante este ELISA de cuantificación.

En la Figura 3 se muestran las medias geométricas (MGC) de las concentraciones calculadas para cada grupo experimental en UA/mL. Las desviaciones estándar de cada grupo se muestran como barras de error.

En los dos ensayos, el PsC Vi conjugado generó una respuesta de IgG superior a 230 UA/mL, mientras que las formulaciones de los grupos control no indujeron una respuesta sustancial contra el polisacárido. Se observaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

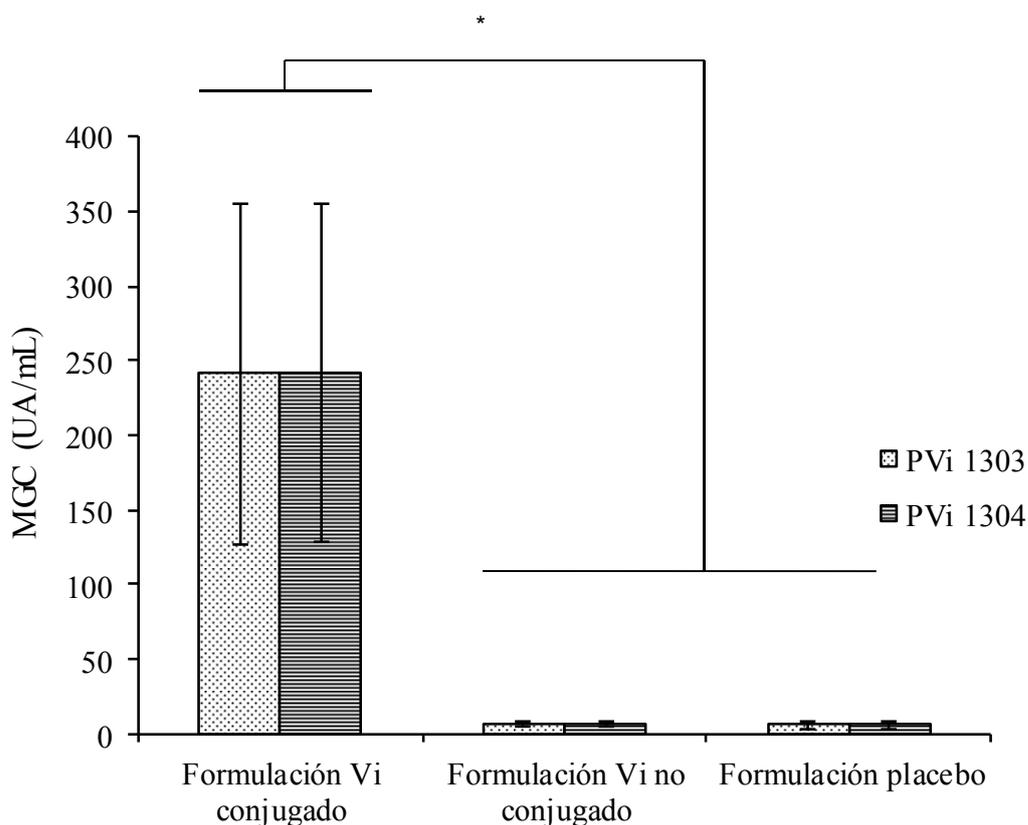


Fig. 3. Aplicación del ELISA de cuantificación en ensayos de inmunogenicidad de poli Vi conjugado. Se observan las medias geométricas (MGC) de las concentraciones de los sueros procedentes de dos ensayos de inmunogenicidad. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar (DE) calculadas.

Tabla 9. Robustez. Temperatura de recubrimiento.

Muestras	Normal	TA	Promedio	DE	CV (%)
Suero 1	41,450	45,470	43,460	2,843	6,541
Suero 2	26,920	31,850	29,385	3,486	11,863
Suero 3	88,590	97,570	93,080	6,350	6,822

Tres sueros se evaluaron en placas recubiertas bajo dos condiciones diferentes: a temperatura ambiente o según el procedimiento estandarizado. En la Tabla se presentan el promedio de las concentraciones (UA/mL), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV) calculados. Se prefijó una $p > 0,05$.

Discusión

Los métodos inmunoenzimáticos constituyen herramientas importantes en las investigaciones clínicas y no clínicas de vacunas. Estas técnicas emergen por la necesidad de caracterizar la respuesta inmune inducida por formulaciones vacunales (11, 12), permitiendo la cuantificación mediante el uso de curvas de dosis/respuesta (10).

Las vacunas contra *S. Typhi* no son un caso diferente; en la literatura se encuentran referencias a ensayos tipo ELISA que se desarrollaron para semicuantificar o cuantificar la respuesta contra el polisacárido capsular contenido en las formulaciones (4, 12, 13).

Un elemento clave en el proceso de investigación y desarrollo de vacunas es la estandarización y validación de los métodos inmunoenzimáticos que se emplean en la evaluación de la inmunogenicidad (12); dado por la necesidad de contar con resultados sólidos y confiables y garantizar que se obtengan por métodos consistentes y reproducibles.

Por esta razón, se desarrolló y validó un ELISA indirecto para cuantificar la respuesta de anticuerpos murinos contra el polisacárido capsular Vi, que genera una molécula candidato vacunal contra *Salmonella Typhi*. Este ELISA constituye un elemento clave en la evaluación inmunológica no clínica de la fase de investigaciones para la obtención de un conjugado de PsC Vi a TD.

En una primera etapa se obtuvo un suero estándar interno para la construcción de la curva de calibración del ensayo. Esta curva permitió suplir la carencia de un suero de referencia internacional de ratón, aún no

disponible en la actualidad (8, 12, 13). Si bien se conoce que en la actualidad se cuenta con la generación de un suero de referencia, tiene como fuente sangre humana, por lo que su uso en las condiciones ensayadas carece de utilidad (14).

La curva de cuantificación se realizó al emplear un suero estándar interno, el cual se obtuvo mediante la mezcla de sueros de ratones respondedores a la inmunización con PsC Vi purificado. La curva de cuantificación mostró una adecuada linealidad en el intervalo que se seleccionó (100-3200), lo cual se corroboró por mediación de un análisis de regresión polinómica y un ensayo de recuperación. Para ambos, se cumplieron los criterios de aceptación que recomiendan las directrices del organismo regulador nacional (CECMED) (15) y los sugeridos por otros autores (10, 16).

En los ensayos de precisión intra e interensayo se obtuvieron buenos resultados. Los CV del intraensayo no superaron el 4%, mientras que los del interensayo estuvieron por debajo del 11%. Leyva y cols, Paul y cols, 2008 y Mandiarote y cols, tuvieron resultados semejantes en ensayos de precisión (17-19) de los ELISA que establecieron para la cuantificación de antígeno de Hepatitis B, de la toxina Cry1Ab y de anticuerpos IgG contra antígenos de vesículas de membrana externa de *N. meningitidis*, respectivamente.

En los ensayos de exactitud, los porcentajes de recobrado estuvieron en el intervalo óptimo. En todos los casos, los valores oscilaron entre 97-107%.

Estos resultados avalan positivamente el ensayo, ya que este parámetro es un elemento clave en el proceso de validación, se debe a que se encuentra estrechamente relacionado con la capacidad del ensayo de brindar un

resultado lo más próximo posible al valor real de la muestra.

Estos porcentajes permiten afirmar que el ensayo es exacto y garantizan la veracidad de las determinaciones que se realizaron mediante el ELISA de cuantificación. Otros autores obtuvieron porcentajes de recobrado similares a los obtenidos en este trabajo (20).

La especificidad fue otro parámetro que se estudió. Para ello se evaluaron 28 sueros de animales inmunizados con conjugados de polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* y *S. pneumoniae*. Todos los sueros presentaron respuestas bajas (inferiores a 0,1 en todos los casos). Por otra parte, la absorbancia de la mezcla de sueros positivos contra PsC Vi fue muy superior a las de los otros sueros.

La demostración de la especificidad constituye una fortaleza del ensayo. Los sueros de los animales contienen, además de los anticuerpos específicos contra el antígeno de interés, otros anticuerpos no específicos. Por esto es deseable que el ensayo de cuantificación posea una especificidad tal, que detecte solamente el analito para el cual se diseñó, sin interferencia de contaminantes de la matriz. Los resultados que se obtuvieron en este trabajo confirman la especificidad del ensayo para detectar anticuerpos del tipo IgG contra PsC Vi sin que la presencia de anticuerpos contra otros polisacáridos o proteínas interfiera en las determinaciones.

En sentido general, los resultados obtenidos en el estudio de robustez permiten afirmar que el ELISA es robusto en las condiciones experimentales de este estudio. Se estudiaron tres factores que influyen sobre los resultados del ELISA: el tiempo de incubación de los sueros, el tiempo de incubación del sustrato y la temperatura de recubrimiento. La comparación estadística entre las concentraciones calculadas en cada uno de los estudios de robustez no mostró diferencias significativas. Además, los CV obtenidos para cada una de las condiciones estudiadas, fueron inferiores al 20%.

Los ensayos tipo ELISA constituyen un método ventajoso para la evaluación de la inmunogenicidad de vacunas contra *S. Typhi* (13), tanto para la evaluación no clínica de las moléculas que se generan en la fase de investigaciones, como para la determinación de la inmunogenicidad del ingrediente farmacéutico activo

del candidato vacunal que se produce en condiciones de buenas prácticas de producción (GMP por sus siglas en inglés). Por tanto, es necesaria la validación del ELISA que garantizará demostrar la inmunogenicidad de las moléculas conjugadas en fases de investigación y desarrollo.

Se evaluaron dos lotes de PsC Vi conjugado a TD obtenidos en condiciones de GMP, para evaluar la aplicabilidad del ELISA en este tipo de ensayos. Los sueros de los animales inmunizados con el conjugado tuvieron niveles de anticuerpos muy superiores a los que se generaron por el polisacárido no conjugado y la formulación placebo.

Estas dos últimas formulaciones generaron respuestas de anticuerpos inferiores a 11 UA/mL, mientras que el menor valor calculado para los grupos experimentales inmunizados con el polisacárido conjugado fue de 139 UA/mL. Este valor es 10 veces superior, lo cual concuerda con lo regulado por la Organización Mundial de la Salud para ensayos de inmunogenicidad de este tipo de vacunas. Según estas regulaciones en materia de calidad, seguridad y eficacia de vacunas conjugadas contra fiebre tifoidea (8), un conjugado debe inducir una respuesta inmune al menos cuatro veces superior a la generada por el polisacárido no conjugado.

Conclusiones

El ELISA de cuantificación que se desarrolló es preciso, exacto, específico y robusto. Los resultados de esta investigación avalan su empleo para cuantificar la respuesta humoral tanto de conjugados como de polisacáridos capsulares de *S. Typhi* en la investigación y desarrollo de nuevos productos.

Referencias

1. WHO. Weekly epidemiological record Typhoid vaccines: WHO position paper. WHO 2008;6(83):49-60.
2. WHO. The immunological basis of immunization series. Módulo 20. Salmonella enterica serovar Typhi (typhoid) vaccines. Geneva: WHO Document Production Services; 2011.
3. Bhutta ZA, Capeding MR, Bavdekar A, Marchetti E, Ariff S, Soofi SB, et al. Immunogenicity and safety of the Vi-CRM197 conjugate vaccine against typhoid fever in adults, children, and infants in south and Southeast Asia: Results from two randomised, observer-blind, age de-escalation, phase 2 trials. *Lancet Infect Dis* 2014;14(2):119-29.

4. Rondini S, Micoli F, Lanzilao L, Hale C, Saul AJ, Martin L. Evaluation of the immunogenicity and biological activity of the *Citrobacter freundii* Vi-CRM197 conjugate as a vaccine for *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clin Vaccine Immunol* 2011;8(3):460-8.
5. Mandal S, Deb Mandal M, Pal NK. Changing Patterns of Antibiotic Resistances of *Salmonella enterica* Serovar Typhi in Kolkata, India. *Advanced Bio Tech* 2013;13(2):1-5.
6. Lu YJ, Zhang F, Sayeed S, Thompson CM, Szu S, Anderson PW, et al. A bivalent vaccine to protect against *Streptococcus pneumoniae* and *Salmonella typhi*. *Vaccine* 2012;30(23):3405-12.
7. Simon R, Levine M. Glycoconjugate vaccine strategies for protection against invasive *Salmonella* infection. *Human Vaccine & Immunotherapeutics* 2012;8(4):1-5.
8. World Health Organization (WHO). Guidelines on the quality, safety and efficacy of Typhoid conjugate vaccines. Geneva: WHO Press; 2013.
9. An SJ, Yoon YK, Kothari S, Kim DK, Kim JA, Kothari N, et al. Immune suppression induced by Vi capsular polysaccharide is overcome by Vi-DT conjugate vaccine. *Vaccine* 2012;30(6):1023-8.
10. Ali A, Jung AS, Cui C, Haque A, Carbis R. Preparation and evaluation of immunogenic conjugates of *Salmonella enterica* serovar Typhi O-specific polysaccharides with diphtheria toxoid. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2012;8(2):189-93.
11. Plikaytis BD, Carlone GM. Program ELISA for Windows User's Manual, version 2. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta: CDC; 2005.
12. Ochoa RF. Técnicas inmunoenzimáticas en el desarrollo clínico de vacunas. La Habana: Finlay Ediciones; 2013.
13. Martínez JC, Ochoa RF, Estrada EA, Riverón L, González M, Ferriol XR, 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.
14. Szu SC, Hunt H, Xie G, Robbins JB, Schneerson R, Gupta RK. A human IgG anti-Vi reference for *Salmonella typhi* with weight-based antibody units assigned. *Vaccine* 2013;31(15):1970-4.
15. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Anexo 1. De las Buenas Prácticas para Laboratorio de Control de Medicamentos. Validación de Métodos Analíticos. Regulación No. 37-2012. La Habana: CECMED; 2014.
16. Olivares MN, 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. *Biología Aplicada* 1999;16(2):113-5.
17. Leyva A, Sánchez JC, López L, Font M, González T, Pérez B, et al. Desarrollo, validación y aplicación de un nuevo ELISA para el control del proceso del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B recombinante. *Biología Aplicada* 2011;28(4):221-7.
18. Paul L, Steinke K, Meyer HH. Development and validation of a sensitive enzyme immunoassay for surveillance of Cry1Ab toxin in bovine blood plasma of cows fed Bt-maize (MON810). *Analytica Chimica Acta* 2008;607(1):106-13.
19. Mandiarote A, Gutiérrez N, Valmaseda T, Sosa R, Ontivero I, Talavera A. Estandarización de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para la cuantificación de anticuerpos IgG inducidos por una vacuna de vesículas de membrana externa de los serogrupos A y W135 de *Neisseria meningitidis*. *VacciMonitor* 2012;21(2):16-23.
20. Cuello M, Acosta Y, Martínez JC, Cabrera O, Ochoa R, Balboa JA, et al. Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG antipolisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C en sueros de ratones. *VacciMonitor* 2001;10(4):7-13.

Validation and application of an ELISA for the quantification of IgG antibodies against *Salmonella* Typhi Vi capsular polysaccharide

Abstract

An indirect ELISA for the quantification of IgG antibodies against the Vi polysaccharide of this bacteria was developed as a part of the stages of Research and Development of a conjugate vaccinal candidate against *Salmonella* Typhi. The results of the validation process are presented in this paper, in which the interval and linearity of the curve, the intra- and inter-assay precision, accuracy, specificity, limit of detection and robustness were determined. The calibration curve generated with an internal standard serum provided a good fit to a polynomial function and an interval between 1/100 and 1/3200 dilutions. The coefficients of variation in the precision and robustness tests and the percentages of recovery were in intervals established for each one ($\leq 10\%$, $\leq 20\%$ and 90-110%, respectively). The assay presented an optimal specificity, obtaining OD signals above 1.3 for positive sera against Vi and low for sera against unrelated antigens. The results support the use of this quantitative ELISA in immunogenicity assays for batch release of Vi conjugates. Likewise, they support their use for the immunogenicity evaluation of Vi polysaccharide formulations and Vi polysaccharide conjugates to proteins in phases of research and development.

Key words: ELISA, *Salmonella* Typhi, Vi polysaccharide, validation, quantification.

Recibido: Agosto de 2014

Aceptado: Septiembre de 2014