

# 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 W<sub>135</sub> de *Neisseria meningitidis*

Aleida Mandiarote,\* Niurka Gutiérrez, Tania Valmaseda, Regla Sosa, Ivis Ontivero, Arturo Talavera, Maylín Álvarez, Yisabel Aranguren, Rolando Felipe Ochoa, Luis García\*\*

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Desarrollo-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805, La Lisa, A.P. 16017 Cod. 11600. La Lisa, La Habana, Cuba.

email:lgarcia@finlay.edu.cu

La enfermedad meningocócica es una afección invasiva, de amplia incidencia mundial, cuyo agente causal es la bacteria gramnegativa *Neisseria meningitidis*. Existen vacunas polisacáridicas sin conjugar o conjugadas, contra cuatro de los cinco serogrupos responsables del 95% de los casos en el mundo. Para el serogrupo B, cuyo polisacárido es pobremente inmunogénico, se han evaluado varios candidatos vacunales producidos a base de vesículas de membrana externa. La determinación de la actividad bactericida y la cuantificación de IgG por ELISA han sido los métodos más utilizados en la medición de la respuesta inmune generada por vacunas contra la meningitis meningocócica. El segundo de estos métodos es utilizado en el Instituto Finlay como ensayo de inmunogenicidad para la liberación de lotes de VA-MENGOC-BC®. Como parte de una colaboración con investigadores noruegos, se trabaja en la obtención de un candidato vacunal contra los serogrupos A y W<sub>135</sub> basado en vesículas de membrana externa. En el presente trabajo se describe la estandarización de un ELISA para ser utilizado en la evaluación de la respuesta inmune del candidato vacunal bivalente.

**Palabras clave:** *Neisseria meningitidis*, ELISA, estandarización, vacuna.

## Introducción

*Neisseria meningitidis* es una bacteria gramnegativa, agente causal de la meningitis meningocócica, enfermedad de distribución mundial. La Organización Mundial de la Salud estima que ocurren anualmente 1,2 millones de casos de enfermedad invasiva y 135.000 muertes (1).

Este microorganismo se divide en 12 serogrupos basados en las características y estructura de su polisacárido capsular. Entre ellos, los serogrupos A, B, C, Y y W<sub>135</sub> son responsables de alrededor del 95% de los casos (2). Recientemente, el serogrupo X ha emergido como causante de la enfermedad en parte del cinturón de la meningitis en África (3).

Existen vacunas a base de polisacáridos sin conjugar o conjugadas con proteínas contra los serogrupos A, C, Y y W<sub>135</sub>, que han demostrado ser eficientes y se encuentran disponibles en el mercado (4, 5). En el caso del serogrupo B, cuyo polisacárido capsular no es inmunogénico, se han evaluado en ensayos clínicos varios candidatos vacunales a base de proteínas de membrana externa (6-9).

Entre el Instituto Finlay y el Instituto Nacional de Salud Pública de Noruega (NIPH) existe un proyecto de colaboración para el desarrollo de una vacuna a partir de vesículas de

membrana externa (VME) de los serogrupos A y W<sub>135</sub> que, aunque no se han desarrollado vacunas a base de VME contra otros serogrupos diferentes del B, su elevada inmunogenicidad y su menor costo de producción las convierten en alternativas o complementos potenciales para las vacunas conjugadas ya existentes.

Dentro de los ensayos de calidad imprescindibles para este nuevo producto está la evaluación de su inmunogenicidad y como parte de él la cuantificación de las unidades (U) de IgG/mL por ELISA para ambos serogrupos.

Sin embargo, no se contaba con técnicas inmunoenzimáticas para este fin, por lo que decidimos su estandarización, previa preparación de los materiales de referencia necesarios, la selección de las curvas de calibración óptimas, la evaluación del paralelismo entre la respuesta de cada serogrupo y las curvas de calibración, así como determinar la especificidad del método y su precisión.

Por otra parte, deben establecerse, previamente, los valores de corte adecuados para discriminar los animales que sean o no respondedores para cada serogrupo; de esta forma contaremos con las herramientas analíticas apropiadas para la evaluación de estas vacunas.

\* Licenciada en Ciencias Farmacéuticas, Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Directora de Control de Calidad.

\*\* Autor para la correspondencia: Lic. en Bioquímica, Doctor en Ciencias de la Salud, Investigador Titular, Director de Investigaciones.

## Materiales y Métodos

### A. Muestras utilizadas

- **Monogranales:** Las VME disueltas en sacarosa se adyuvaron en gel de hidróxido de aluminio en una proporción 1:40. Se prepararon dos monogranales para el serogrupo A, a partir de VME, procedentes de ambas cepas de producción y un monogranal para el serogrupo  $W_{135}$ .
- **Vacunas monovalentes:** Se prepararon a partir de los monogranales de cada serogrupo. Los mismos se diluyeron 1/4 con amortiguador fosfato salino 0,15 M, sacarosa al 3%, pH 7,2 (AFSS).
- **Vacuna bivalente:** Preparada a partir de la mezcla a partes iguales de los monogranales de ambos serogrupos, con el mismo amortiguador descrito, empleado como diluyente. La vacuna contiene 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteínas totales (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada serogrupo).
- **Placebo:** Se preparó a partir de la dilución del gel de hidróxido de aluminio con AFSS, de modo que todos los componentes de la formulación, excepto las VME, quedaran con la misma concentración que la vacuna bivalente.

### B. Material biológico

- **Cepas:** Para la obtención de las VME se emplearon tres cepas de *Neisseria meningitidis*, dos de ellas del serogrupo A y una del  $W_{135}$ , las que fueron recibidas del NIPH. Las cepas del serogrupo A fueron aisladas de pacientes etíopes e identificadas como Mk499/03 y Mk682/02.

La del serogrupo  $W_{135}$  fue aislada de un paciente en Burkina Faso y codificada como Mk222/02. Se elaboraron lotes de referencia, empleando agar Mueller Hinton.

Los cultivos se conservaron por liofilización en sacarosa-caldo triptona soya no animal. A partir de estos lotes de referencia se elaboraron lotes de trabajo; los cultivos se realizaron en medio líquido Frantz modificado, al cual se le añadió glicerol al 10% y se conservaron en congelación a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **Animales:** Se utilizaron ratones de la línea Balb/c, entre 17-22 g de peso, provenientes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorios (CENPALAB). Los animales se recibieron en las instalaciones del laboratorio de pruebas biológicas de la Dirección de Calidad y permanecieron al menos 48 h en cuarentena antes de su uso.

Durante este tiempo y el que demoraron los ensayos se les suministró agua y comida a libre demanda.

### C. Preparación de los materiales de referencias de trabajo

**Material de recubrimiento:** Los lotes de VME de recubrimiento de tres procesos de producción se precipitaron al 80% en etanol y 50 mL de las fracciones cromatográficas. Dos de ellos a partir de dos cepas del serogrupo A y un proceso a partir de la cepa perteneciente al serogrupo  $W_{135}$ . Los precipitados alcohólicos fueron resuspendidos en agua para inyección, previa sonicación por 15 min a temperatura entre  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para lograr una concentración teórica de 1,5 mg/mL de proteínas. Se tomó una muestra de cada suspensión, las cuales fueron evaluadas por Lowry (10). Luego se realizó la distribución a razón de 250  $\mu\text{L}$  por bulbo, los que se almacenaron entre  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Esquema de inmunización para la obtención de suero hiperinmune:** Se inmunizaron con cada vacuna monovalente a 50 ratones por vía intraperitoneal. Se empleó un esquema de dos dosis de 0,5 mL c/u, con un intervalo de 28 días entre dosis. Las vacunas monovalentes fueron codificadas como M-002A, M-003A y M-002W que indican, además, los procesos en que se obtuvieron.

- **Obtención de suero hiperinmune:** Concluido el esquema de inmunización los animales fueron desangrados. Se separó el suero de cada animal y luego se realizó una mezcla con los sueros de los 50 ratones inmunizados con cada vacuna. A la muestra de los sueros se le realizó el proceso de descongelación-congelación tres veces para lograr la estabilización de la respuesta. Luego fueron filtrados con 0,2  $\mu\text{m}$ , se separaron 6 alícuotas de 0,1 mL de cada lote para las pruebas inmediatas y el resto se distribuyó en viales de 4,5 mL, los que se conservaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las alícuotas se evaluaron por ELISA y en dependencia de la D.O. observada se realizaron las diluciones de los sueros: 118 veces para 002A, 77 el 003A y 38 el 002W. Se empleó como diluyente seroalbúmina bovina al 6% en amortiguador Tris 0,15 M, pH 7,2. A los sueros diluidos se les asignó un valor arbitrario de 5000 U IgG/mL.
- **Obtención de sueros para la estandarización de los ensayos:** Se inmunizaron 10 animales por cada lote de la vacuna bivalente (VME de ambos serogrupos A y W) mediante el esquema de dos dosis por vía subcutánea, de 2  $\mu\text{g}$  (1+1) por dosis, con 21 días de diferencia. Los animales fueron desangrados 15 días posteriores a la segunda inmunización.

### D. Estandarización de los ensayos

- **Titulación del recubrimiento:** Se emplearon sueros positivos con títulos de anticuerpos contra los serogrupos A y  $W_{135}$ , un suero negativo y el blanco reactivo. Se evaluaron concentraciones entre 0 y 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se definió

como concentración óptima de recubrimiento aquella con la que se alcanzó la meseta de mayor señal con los sueros positivos y la menor para los negativos y el blanco reactivo, resultado que debe repetirse en una serie de diferentes concentraciones cercanas.

- **Titulación del conjugado:** Se utilizaron los mismos sueros descritos en el punto anterior. El conjugado se tituló en diluciones entre 1:5000 y 1:10000, con incrementos de 500. Se seleccionó como dilución óptima aquella cuya razón suero positivo/suero negativo fue mayor.
- **Evaluación del rango lineal de la curva de calibración:** Se realizaron tres ensayos en los que se evaluaron 12 diluciones seriadas con factor dos de cada suero hiperinmune, comenzando desde 1/50. En cada ensayo se procesaron seis réplicas de cada suero. Se seleccionaron curvas compuestas por siete puntos, correspondientes a aquellas diluciones que alcanzaran un coeficiente de determinación ( $R^2$ )  $\geq 0,98$ , un coeficiente de correlación ( $r$ )  $\geq 0,99$ , así como un coeficiente de variación (CV) menor del 10% entre las concentraciones de cada punto, una vez corregidas por el factor de dilución. El CV debe ser menor del 20% entre los tres ensayos realizados.
- **Evaluación del paralelismo:** Esta prueba fue empleada para avalar la linealidad y estimar la exactitud del método. Se procesaron en el mismo ensayo dos réplicas de cada punto de la curva de calibración a las diluciones previamente seleccionadas, con al menos seis réplicas de cuatro diluciones de suero, desde 1/1600 hasta 1/12800, de siete muestras procedentes de los animales inmunizados con la vacuna bivalente (VME de ambos serogrupos A y W), como fue descrito anteriormente. Se realizaron tres ensayos ELISA, uno para cada proceso: 002A, 003A, 002W. Se calculó el  $R^2$  de cada curva obtenida que debe ser  $\geq 0,98$ , así como el CV entre las concentraciones de cada muestra, una vez corregidas por el factor de dilución, que debe ser inferior al 10%.
- **Precisión**

*Intraensayo.* Se evaluó la repetibilidad a través del análisis de seis réplicas de dos sueros de concentraciones que estuvieran en el rango de la curva de calibración, para cada uno de los ELISA estudiados.

*Intermedia.* Se analizaron los resultados obtenidos por el mismo analista, según se describió anteriormente, durante tres días consecutivos dentro del laboratorio.

*Reproducibilidad.* Se evaluaron en dos laboratorios independientes, con un analista por laboratorio, los 30 sueros obtenidos de ratones inmunizados con tres lotes de vacuna (10 ratones por lote). Cada suero

individual se dividió en dos alícuotas y fueron enviadas a ciegas a cada laboratorio.

El CV se utilizó para estimar la imprecisión entre las réplicas, considerándose como óptimo los valores inferiores a 10% para la precisión intraensayo y del 20% para la intermedia y la reproducibilidad.

- **Especificidad:** Se evaluó a través de dos metodologías:
  - Se inocularon con placebo 10 ratones con el mismo esquema de inmunización que el utilizado para la vacuna bivalente. Los sueros individuales se evaluaron por ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG contra ambos serogrupos. Se emplearon VME como antígeno de captura para cada serogrupo. En cada placa se ubicó la curva de calibración correspondiente al serogrupo de que se trate. Como criterio de aceptación se estableció que la respuesta del placebo debía ser inferior al primer punto de la curva de calibración correspondiente.
  - A partir de la evaluación de los sueros provenientes de los animales inoculados con vacunas monovalentes y enfrentados al antígeno de captura heterólogo, para descartar respuesta cruzada. Se siguió como criterio de aceptación que los sueros de los animales inmunizados con la monovacuna de A resultaran no respondedores para el serogrupo  $W_{135}$  y de igual forma se comportaron los sueros provenientes de las monovacunas  $W_{135}$  para el serogrupo A.
- **Valores de corte:** Para establecer los valores de corte que permitan discriminar los animales que respondieron adecuadamente de aquellos que no, se procesaron los resultados de varios lotes evaluados para ambos serogrupos. Se aplicó la prueba Kruskal-Wallis para evaluar la existencia o no de diferencia entre los grupos. Se evaluaron 8 grupos (65 valores) en el caso del serogrupo A, y 6 grupos (54 valores) para el serogrupo W. Los límites de corte se estimaron a partir del cálculo de la media de la respuesta para cada serogrupo menos dos desviaciones estándar (DE), para un 95% de confianza.

## D. Descripción de los ELISA

En todos los casos se utilizó un ensayo inmunoenzimático en fase sólida, cuantitativo, de tipo indirecto, donde los anticuerpos que contienen la muestra (sueros de animales inmunizados con la vacuna) se unen con las proteínas acopladas a la fase sólida, y son reconocidos por un conjugado anti-IgG de ratón-fosfatasa alcalina y detectados mediante una reacción enzimática que emplea un sustrato cromogénico. A mayor intensidad del color, mayor presencia de anticuerpos en la muestra.

Para la sensibilización de las placas se aplicaron 100  $\mu$ L de VME a la concentración óptima de recubrimiento evaluada,

diluidas en solución reguladora de carbonato-bicarbonato 0,05M, en placas de 96 pocillos para ELISA (NUNC, Maxisorp). Se incubaron durante 12-18 h entre 2-8 °C en cámara húmeda. Después fueron lavadas cuatro veces con 300  $\mu$ L por pocillo con Tween 20 al 0,05% v/v. Se realizó el bloqueo con 150  $\mu$ L de solución de BSA 0,1% por pocillo y fueron incubadas de 20 a 25 °C en cámara húmeda durante 1 h, y posteriormente lavadas. Las muestras de sueros se diluyeron con solución amortiguadora de fosfato pH 7,2-7,4 y leche descremada al 3% (p/v). De cada una de las diluciones de las muestras se aplicaron 100  $\mu$ L por pocillo y por duplicado.

La placa se incubó a  $37 \pm 1$  °C durante 1 h en cámara húmeda y más tarde fue lavada. Se adicionó 100  $\mu$ L por pocillo de la dilución seleccionada del conjugado A1047 (Sigma, USA). Se incubó durante 1 h a  $37 \pm 1$  °C y posteriormente se lavó. A continuación se aplicó 100  $\mu$ L por pocillo de sustrato p-nitrofenil fosfato a 1 mg/mL en solución reguladora de dietanolamina pH 9,8. La placa fue incubada por 30 min en la oscuridad y se detuvo la reacción con 50  $\mu$ L por pocillo de la solución de NaOH 2 N. Se leyeron a 405 nm en un lector de placas de ELISA.

## Resultados y Discusión

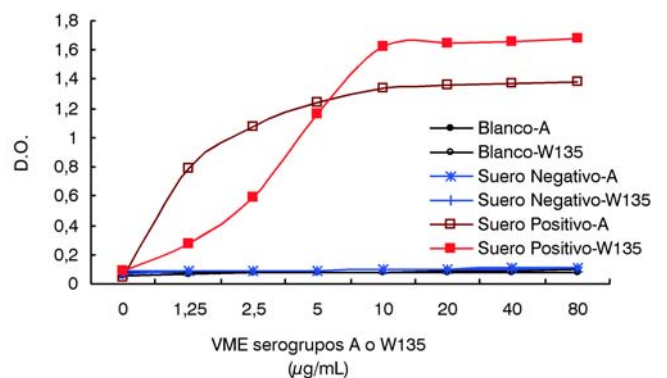
Las vacunas contra *N. meningitidis* serogrupo B a base de vesículas de membrana externa han demostrado ser seguras y eficaces. Se han encontrado incrementos en la actividad bactericida contra la cepa homóloga entre el 96% y 98% de los vacunados en todos los grupos de edades (11). Estudios previos encuentran inducción de memoria inmune y prolongada duración de la respuesta, luego de la administración de dos o tres dosis (12, 13). Norheim y colaboradores (14) obtienen candidatos vacunales a base de VME del serogrupo A, con demostrada inmunogenicidad en ratones. Como parte de una colaboración con el NIPH, científicos del Instituto Finlay trabajan en la obtención de un candidato vacunal bivalente a base de VME obtenidas de cepas pertenecientes a los serogrupos A y  $W_{135}$  (15).

A pesar de que se considera la determinación del título de anticuerpos bactericidas como el mejor correlato de protección contra la enfermedad meningocócica, la determinación de anticuerpos por ELISA contra antígenos capsulares y subcapsulares de *N. meningitidis*, es una técnica muy empleada en la evaluación de vacunas y liberación de lotes, como ensayo de inmunogenicidad y el estudio de candidatos vacunales a base de VME (16-18).

Este trabajo resume el proceso de estandarización de técnicas inmunoenzimáticas para la cuantificación de las unidades de IgG/mL que induce en ratones la vacuna bivalente contra los serogrupos A y  $W_{135}$ , producida a base de VME del microorganismo.

Se prepararon tres lotes de VME de recubrimiento, los cuales se codificaron como 002A, 003A y 002W, coincidiendo con los procesos de producción de los que partieron. La concentración de proteínas de cada uno de ellos resultó de 0,82; 1,62 y 1,52 mg/mL, respectivamente. El lote 002A presentó dificultades durante el proceso de resuspensión, lo cual consideramos sea la razón de la diferencia de concentración con respecto a la teórica. Los otros lotes se comportaron según lo esperado.

La preparación de dos lotes para el serogrupo A se justifica, ya que en las etapas iniciales del proyecto se evaluaron en producción dos cepas de este serogrupo. Las formulaciones finales se evaluaron utilizando recubrimiento y curva en correspondencia con cada una de ellas. El lote 002A se utilizó en la evaluación de los sueros de las formulaciones destinadas a la evaluación de la cepa Mk686/02 y el lote 003A en las provenientes de la cepa Mk499/03. Se obtuvieron al final 77 bulbos del lote 002A, 198 del lote 003A y 137 del lote 002W, los cuales deben ser suficientes para la evaluación



**Fig. 1.** Titulación de las VME de los serogrupos A y  $W_{135}$  como recubrimiento.

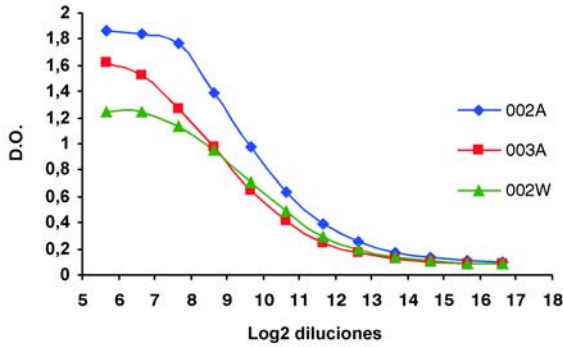
de los lotes que serán producidos en la etapa de investigación-desarrollo de este producto.

La Figura 1 muestra los resultados de la titulación del recubrimiento para las VME de los serogrupos A y  $W_{135}$ . La concentración de recubrimiento óptima para las VME de ambos serogrupos resultó ser 10  $\mu$ g/mL.

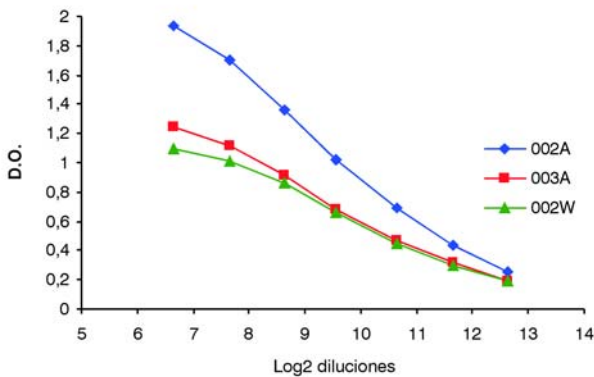
Al evaluar la dilución óptima del conjugado, se observó que la mayor relación entre el suero positivo respectivo y el suero negativo fue de 1:8500, coincidente para ambas VME.

Se obtuvieron tres sueros hiperinmunes, uno por cada variante (002A, 003A, 002W). La Figura 2 muestra el comportamiento de las curvas, las cuales muestran el típico comportamiento sigmoide.

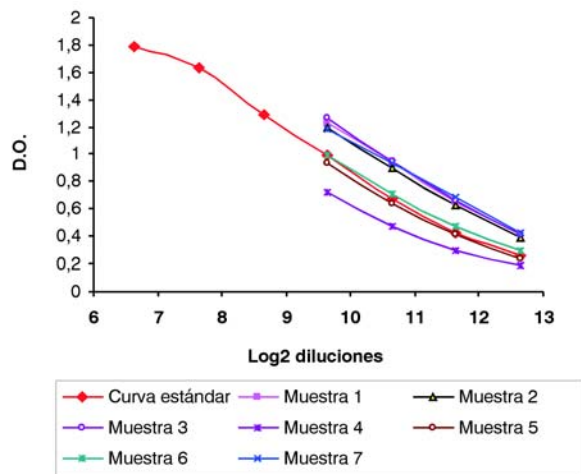
Para cada variante se seleccionaron las siete diluciones con las que se lograron los coeficientes de determinación y variación óptimos, según lo descrito en materiales y métodos,



**Fig. 2.** Exploración del rango lineal de las curvas de cada suero hiperinmune. Diluciones entre 1/50 a 1/102400.



**Fig. 3.** Curvas de rango lineal para las diluciones seleccionadas.  
 Variante 002A.  $R^2 = 0,9925$ ;  $r = 0,9962$   
 Variante 003A.  $R^2 = 0,9917$ ;  $r = 0,9958$   
 Variante 002W.  $R^2 = 0,9895$ ;  $r = 0,9947$



**Fig. 4.** Paralelismo curva - respuesta anti A para el lote producido a partir de VME del serogrupo A con la cepa Mk686.

que coincidieron para los tres sueros. Las diluciones finales seleccionadas para ser usadas en las curvas de calibración para cada ensayo fueron desde 1/100 hasta 1/6400, con la que se obtuvieron  $R^2$  y  $r$  mayores a 0,99. La Figura 3 muestra las curvas seleccionadas con su correspondiente  $R^2$ .

Se evaluó, además, el paralelismo entre la respuesta de la curva de calibración y la obtenida en sueros de ratones inmunizados con las vacunas bivalentes respectivas, pero utilizando el esquema de inmunización propuesto para este producto, que difiere en el número y concentración de las dosis, así como la vía de administración, según describen Norheim y colaboradores (15). Los sueros individuales de cada animal fueron evaluados para medir la respuesta específica contra ambos serogrupos.

En la Figura 4 se muestra el comportamiento de los valores promedios de cada suero con respecto a la curva de calibración obtenida a partir de VME del serogrupo A con la cepa Mk686 (002A). Similar resultado se alcanzó al evaluar las curvas de calibración 003A y 002W. En todos los casos los  $R^2$  obtenidos fueron superiores a 0,98 y el CV entre las concentraciones de cada muestra fue inferior al 10%, una vez corregidos los valores obtenidos por el factor de dilución. Lo que avala la linealidad de la respuesta, la cual es aún superior cuando se trabaja con el modelo ajustado logístico con cuatro parámetros del programa del CDC (Atlanta, USA) que empleamos en nuestros cálculos (19).

A partir de este análisis se seleccionaron las diluciones que mantenían el paralelismo con la curva para ser usadas en los ensayos posteriores. En el caso del serogrupo A las diluciones fueron desde 1/1600 hasta 1/6400 y para el serogrupo  $W_{135}$  desde 1/200 a 1/800.

Las Tablas 1 y 2 muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión intraensayo e intermedia para ambos serogrupos, donde se obtuvieron valores de CV por debajo del 10% y del 20%, respectivamente, resultados esperados para este tipo de ensayos.

En las Tablas 3 y 4 se resumen los resultados obtenidos de la reproducibilidad para ambos ensayos, donde de igual forma se registraron resultados de CV menores del 20%, lo que avala la reproducibilidad del método.

En la evaluación en general de este indicador se seleccionaron muestras de diferente actividad, con el objetivo de verificar la precisión en el rango en que mayormente se mueven los resultados de las muestras.

Fue importante, además, la evaluación de la especificidad de la respuesta obtenida por la vacuna, para lo que se realizaron dos variantes, descritas en materiales y métodos. Los sueros de los ratones inoculados con placebo no mostraron actividad contra los serogrupos  $W_{135}$  y A, lo que demuestra la no interferencia del resto de los componentes

**Tabla 1.** Precisión intraensayo e intermedia del ELISA anti A.

Muestras (n=2)	Placa 1		Placa 2		Placa 3		Precisión intermedia	
	Media U IgG/mL	CV(%)	Media U IgG/mL	CV(%)	Media U IgG/mL	CV(%)	Media U IgG/mL	CV(%)
1	6902	4,31	8046	8,47	7867	9,64	7605	8,09
2	15529	3,87	12144	8,19	11060	9,21	12911	18,06

**Tabla 2.** Precisión intraensayo e intermedia del ELISA anti W<sub>135</sub>.

Muestras (n=2)	Placa 1		Placa 2		Placa 3		Precisión intermedia	
	Media U IgG/mL	CV(%)	Media U IgG/mL	CV(%)	Media U IgG/mL	CV(%)	Media U IgG/mL	CV(%)
1	1132	2,88	1609	1,53	1585	1,23	1442	18,64
2	3902	9,1	4237	3,9	3828	9,8	3989	5,46

de la formulación (gel de hidróxido de aluminio, sacarosa, amortiguador) en la actividad biológica.

En el caso de la evaluación de los sueros de los ratones inmunizados con las vacunas monovalentes, empleando los dos sistemas de ensayo (curva-recubrimiento 003A y curva-recubrimiento 002W) arrojó también resultados satisfactorios, mostrando valores de D.O. en la respuesta cruzada menores que el primer punto de las curvas.

Ambos resultados demuestran que el método es específico para la cuantificación de la respuesta antimeningocócica generada a partir de VME de los serogrupos A o W<sub>135</sub>, así como la no interferencia del resto de los componentes de la formulación en la respuesta.

Con los datos acumulados del análisis de diferentes formulaciones para ambos serogrupos se calcularon los valores de corte para cada uno de ellos. En el caso del serogrupo A nos limitamos a la cepa Mk 499/03 seleccionada para la producción.

En la Tabla 5 se presentan los resultados de la actividad anti A de las ocho muestras producidas en similares condiciones, lo cual permitió realizar el análisis estadístico para el cálculo del nivel de corte para este serogrupo. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $p=0,14776$ ) y el valor de corte para el serogrupo A, con un 95% de confianza, resultó ser  $>2344$  U IgG/mL.

En el caso del serogrupo W<sub>135</sub>, se procesaron los resultados de seis muestras también formuladas en similares condiciones. No se encontró diferencia entre los grupos ( $p=0,762129$ ) y el valor de corte con un 95% de confianza resultó ser  $>215,4$  U IgG/mL. En la Tabla 6 se muestran los resultados de actividad para este serogrupo.

Estos valores de corte son lógicos ya que, como puede observarse en las tablas, los resultados de actividad para el

**Tabla 3.** Evaluación de la reproducibilidad del ELISA anti A.

Muestras (n=3)	Media U IgG/mL		Precisión interlaboratorio	
	Lab 1	Lab 2	Media U IgG/mL	CV(%)
1	14983	16295	15639	5,93
2	7643	9997	8820	18,87
3	10794	10857	10826	0,41

**Tabla 4.** Evaluación de la reproducibilidad del ELISA anti W<sub>135</sub>.

Muestras (n=3)	Media U IgG/mL		Precisión interlaboratorio	
	Lab 1	Lab 2	Media U IgG/mL	CV(%)
1	1499	1730	1615	10,1
2	2156	2334	2245	5,61
3	1677	1740	1709	2,61

serogrupo A son diez veces superiores a los del serogrupo W<sub>135</sub>. Se corresponde, además, con el empleo de diluciones menores a los sueros de este último serogrupo.

Estos valores permiten, además de dar los resultados de cada lote evaluado en U IgG/mL para cada serogrupo, discriminar los animales no respondedores y dar el resultado final en por ciento de respondedores, tal y como se ha establecido en las especificaciones de calidad de esta vacuna, además de evaluar la respuesta individual de los animales. No obstante, los mismos serán reevaluados cuando se cuente con un mayor número de resultados.

En el presente estudio se prepararon los lotes de materiales de referencia de trabajo para ser utilizados como recubrimiento en los ensayos ELISA, con el propósito de medir

**Tabla 5.** Resultados de actividad anti A expresados en U IgG/mL.

Ratones/Muestras	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6	M-7	M-8
1	14457	14536	14340	18578	33096	-	34581	17063
2	18088	14946	16295	17273	28130	17526	20074	14004
3	3858	13233	18548	19109	14002	21109	27613	7841
4	22458	12142	9862	6260	18344	22144	30134	30482
5	7235	16560	21874	9730	14129	23459	27146	27310
6	9158	15475	17431	11448	-	9242	21266	11176
7	11345	17991	14003	18532	-	17407	12462	1487
8	14927	-	18289	8454	-	34815	7718	11933
9	17705	-	-	-	-	18678	20873	13340
10	23469	-	-	-	-	-	-	22151

**Tabla 6.** Resultados de actividad anti W expresados en U IgG/mL.

Ratones/muestras	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6
1	2932	1466	1181	-	1432	1940
2	2869	1924	1495	1183	1274	2130
3	1988	1467	670	1375	1111	973
4	1660	1795	2362	4061	1781	2857
5	1013	1592	1282	1125	215	1566
6	1366	1834	1705	3274	2287	1266
7	1921	1680	1029	4127	2350	2995
8	1321	1419	2183	-	1597	636
9	1976	1285	2017	-	1525	955
10	2352	-	2841	-	1452	-

la respuesta inmune generada a partir de la administración de VME purificada de dos cepas de *N. meningitidis* del serogrupos A y una del serogrupo W<sub>135</sub>. Paralelamente se estandarizaron las curvas de calibración y se comprobó su paralelismo y la respuesta para cada variante. El método demostró ser específico y preciso para el propósito y se definieron los valores de corte en U IgG/mL para considerar respondedores o no a los animales en ambos serogrupos.

## Referencias

- Harrison LH, Trotter CL, Ramsay L. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine* 2009;27S:B51-B63.
- Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 2007;369:2196-210.
- Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha MK, Jeanne I, Maïnassara HB, et al. Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. *Clin Infect Dis* 2007;44:657-63.
- Bilukha OO, Rosenstein N. Prevention and control of meningococcal disease. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2005;54:1-21.
- Reisinger KS, Baxter S, Block S, Shah J, Bedell L, Dull PM. Quadrivalent meningococcal vaccination of adults: Phase III comparison of an investigational conjugate vaccine men ACWY-CRM, with the licensed vaccine Menactra. *Clin Vac Immunol* 2009;16:1810-5.
- Holst J, Feiring B, Fuglesang JE, Høiby EA, Nøkleby H, Aaberge IS, Rosenqvist E. Serum bactericidal activity correlates with the vaccine efficacy of outer membrane vesicle vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *Vaccine* 2003;21:734-7.
- Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, García IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* 1991;14:195-207.
- Jackson C, Lennon D, Wong S, Yan J, Stewart J, Ester P, et al. Antibody persistence following Men NZB vaccination of adults and children and response to a fourth dose in toddlers. *Arch Dis Chile* 2011;96:744-51.
- Giuliani MM, Adu-Bobie J, Comanducci M, Arico B, Savino S, Santini L, et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *PNAS* 2006;103:10834-9.



10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. A protein measurement with the folin-phenol reagent. *Biol Chem* 1951;193:265-75.
11. Borrow R, Balmer P, Millar E. Meningococcal surrogates of protection-serum bactericidal antibody activity. *Vaccine* 2005;23:2222-7.
12. Rosenqvist E, Høiby EA, Wedege E, Bryn K, Kolberg J, Klem A, et al. Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infect Immun* 1995;63:4642-52.
13. Perkins BA, Jonsdottir K, Briem H, Griffiths E, Plikaytis BD, Høiby EA, et al. Immunogenicity of two efficacious outer membrane protein-based serogroup B meningococcal vaccines among young adults in Iceland. *J Infect Dis* 1998;177:683-91.
14. Norheim G, Aase A, Caugant D, Høiby A, Fritzsønn E, Tangen T, et al. Development and characterisation of outer membrane vesicle vaccines against serogroup A *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2005;23:3762-74.
15. García L, Mandiarote A, Norheim G, González D, Reyes G, Tunheim G et al. Scale-up of process for GMP production of a serogroup A and W<sub>135</sub> meningococcal outer membrane vesicle for Africa. In: 17<sup>th</sup> International Pathogenic *Neisseria* Conference; 2010, Sept 11-16; Banff, Alberta, Canadá 2010. p. 227.
16. Norheim G, Høiby A, Caugant D, Namork E, Tangen T, Fritzsønn E, Rosenqvist E. Immunogenicity and bactericidal activity in mice of an outer membrane protein vesicle vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroup A disease. *Vaccine* 2004;22:2171-80.
17. Andersen J, Berthelsen L, Lind I. Measurement of antibodies against meningococcal capsular polysaccharide B and C in Enzyme-linked Immunosorbent Assay towards an Improved Surveillance of Meningococcal Disease. *Clin Diag Lab Immunol* 1997;4:345-51.
18. Morley S, Cole M, Ison C, Camaraza MA, Sotolongo F, Anwar N, et al. Immunogenicity of a serogroup B meningococcal vaccine against multiple *Neisseria meningitidis* strains in infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20:1054-61.
19. Plikaytis BD, Turner SH, L Gheesling L and 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;29:1439-46.

---

## **Standardization of immunoenzimatic assays (ELISA) for the quantitative determination of IgG antibodies elicited by an-outer-membrane-vesicle vaccine from *Neisseria meningitidis* serogroups A and W<sub>135</sub>**

### **Abstract**

Invasive meningococcal disease constitutes a worldwide health problem. Gram negative bacteria, *Neisseria meningitidis* is the causal agent of this disease. Plain or conjugated polysaccharide vaccines are available against four of five serogroups responsible of more than 95% of cases in the world. Because serogroup B polysaccharide is non immunogenic, some vaccine candidates, based on outer membrane proteins have been obtained and evaluated in clinical trials. Bactericidal activity determination and ELISA IgG have been used to evaluate immune response generated by antimeningococcal vaccines. The latter has been used, as potency test, to release VA-MENGO-BC® vaccine lots, produced at Finlay Institute. As a result of the collaboration with Norwegian researchers, a vaccine candidate based on outer membrane proteins against serogroups A and W<sub>135</sub>, has been obtained and evaluated in animal models. The current work describes the standardization of an ELISA method to be used in the immune response evaluation of the bivalent vaccinal candidate.

**Keywords:** *Neisseria meningitidis*, ELISA, Standardization, Vaccine.

---