

Validación del ensayo bactericida en suero para los serogrupos A, C y W₁₃₅ de *Neisseria meningitidis*

Bárbara Cedré,* Yaremis Hernández, Ileana Delgado, Luis Izquierdo, Luis García

Vicepresidencia de Investigación-Desarrollo. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Desarrollo-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805. CP: 16011. La Lisa, La Habana, Cuba.

email:bcedre@finlay.edu.cu

El ensayo bactericida en suero se considera la herramienta más eficaz para medir el estado de la inmunidad en individuos vacunados contra *N. meningitidis* y constituye el soporte analítico para el desarrollo de las vacunas a base de polisacáridos. Las normas de Buenas Prácticas de Fabricación y control de la calidad de productos farmacéuticos plantean que la validación debe aplicarse tanto a los procesos de fabricación como a los métodos de análisis y de control. Es de particular interés en el caso de los bioensayos con resultados más variables que los métodos fisicoquímicos. Por esta razón se llevó a cabo la validación del ensayo bactericida por el método de la placa inclinada, para los serogrupos A, C y W₁₃₅, mediante la determinación de la precisión, especificidad, exactitud y robustez del mismo. Los resultados estuvieron dentro del criterio de aceptación para este tipo de prueba, por lo que se considera apto para la evaluación de la respuesta inmune estimulada por vacunas polisacáridicas de los serogrupos A, C y W₁₃₅ contra la meningitis meningocócica.

Palabras clave: *N. meningitidis*, ensayo bactericida, validación.

Introducción

El papel de los anticuerpos circulantes y el complemento en la protección de las vacunas antimeningocócicas se demuestra desde el año 1918 (1, 2). Desde entonces los investigadores han tratado de desarrollar pruebas *in vitro* que permitan predecir el potencial protector de los anticuerpos séricos.

El ensayo bactericida se considera la prueba de oro para evaluar la capacidad de las vacunas antimeningocócicas de inducir anticuerpos con actividad lítica sobre *Neisseria meningitidis* (3, 4) y es el correlato serológico primario en el desarrollo de las vacunas antimeningocócicas (5, 6).

La evaluación de la actividad bactericida sérica involucra la exposición de una suspensión de organismos viables a una concentración adecuada de anticuerpos y del complemento, la incubación a una temperatura óptima para la actividad del complemento y la determinación, después de un periodo de tiempo apropiado de la concentración o el número de células sobrevivientes por algún método directo o indirecto.

El ensayo bactericida del suero ofrece una medida de la capacidad funcional de los anticuerpos, en conjunto con el complemento para lisar bacterias. Un ensayo bactericida exitoso se basa en crear las condiciones para que el anticuerpo reconozca los antígenos expuestos en la superficie bacteriana y se una al complemento, lo que resulta en bacteriolisis y muerte del organismo diana (4). Existen diferentes protocolos estandarizados en los laboratorios donde se producen y evalúan vacunas contra la meningitis meningocócica, siendo los más empleados el método de agar

de recubrimiento (7) y el de la placa inclinada (8). En este último la lectura se realiza mediante un contador automático de colonias, lo que hace los resultados más exactos y reproducibles, además de que permite leer un número mayor de muestras en un breve periodo de tiempo.

La validación de ensayos analíticos es la metodología establecida para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un proceso de fabricación o método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos. Las normas de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y el control de la calidad de los productos farmacéuticos plantean que la validación debe aplicarse tanto a los procesos de fabricación como a los métodos de análisis y control (9).

En el Instituto Finlay se desarrollan y producen vacunas antimeningocócicas contra la mayoría de los serogrupos patógenos de *N. meningitidis*. Por tal motivo resulta imprescindible asegurar que este procedimiento analítico ofrezca resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el uso previsto. Este trabajo tuvo como objetivo validar el ensayo bactericida para los serogrupos A, C y W₁₃₅ de *N. meningitidis* por el método de la placa inclinada, mediante la determinación de la precisión, exactitud, especificidad y robustez del mismo.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y sueros

Para el ensayo bactericida se usó como cepas blanco las recomendadas por el CDC para la determinación de

* Lic. en Microbiología, Dra. en Ciencias de la Salud, Investigador Auxiliar. Jefa Laboratorio de Bactericida.

anticuerpos con actividad lítica, inducidos como respuesta a las vacunas polisacáridicas de *N. meningitidis*. Estas fueron: la cepa F8238 de serogrupo A, la C11 de serogrupo C y la S4383 de serogrupo W₁₃₅. Las mismas se conservaron en solución de Greaves a -70 °C hasta su uso. Para su validación se escogieron tres sueros de individuos vacunados con polisacárido capsular de meningococos de los serogrupos A, C y W₁₃₅, los cuales mostraron diferentes niveles de respuesta para cada uno de los serogrupos. Como control positivo se usó una mezcla de suero de 20 individuos vacunados con una vacuna polisacáridica de los serogrupos ACYW₁₃₅, producido por el CDC en 1992 y usado como material de referencia (código 99/706) para los ensayos ELISA y Bactericida (10).

Ensayo bactericida

Este se realizó por el método de la placa inclinada (8). El día anterior a la prueba se sembraron las cepas de referencia por agotamiento en placas de agar sangre de carnero al 5% y se incubaron durante 18-24 h a 37 °C, con 5% de CO₂. A la mañana siguiente se transfirieron colonias aisladas a otra placa del mismo medio y se incubaron por 4 h bajo las mismas condiciones. Se preparó una suspensión celular en solución de Hank que contenía seroalbúmina bovina (BSA) al 0,1% en el caso de los serogrupos C y W₁₃₅, la cual se ajustó a una DO de 0,1 a 650 nm que equivale, aproximadamente, a 2x10⁸ UFC/mL. La suspensión fue diluida hasta una concentración de 4x10⁴ UFC/mL para su uso.

En placas de microtitulación de 96 pozos estériles con fondo en U se realizaron diluciones dobles de los sueros a evaluar, luego de haber sido inactivados con calor a 56 °C por 30 min para eliminar la actividad bactericida intrínseca. En todos los casos se usó como diluyente solución de Hank con rojo fenol. Las columnas 10, 11 y 12 de la microplaca constituyen los controles de complemento, de suspensión y de suero, respectivamente. En cada placa se evaluó un control positivo de título conocido y un control negativo.

Se añadió a cada pozo de la microplaca 10 µL de la suspensión celular y 10 µL de suero de conejo de 3-4 semanas de nacido (Pel Freez, USA) como fuente de complemento. Las placas se agitaron en un agitador de placas (Heidolph, Alemania) a 1050 rpm durante 20 segundos para lograr una completa mezcla de los reactivos que se incubaron durante 1 h a 37 °C. Luego de la incubación se procedió a la extracción de 10 µL de cada uno de los pozos y la siembra en placas de agar sangre por el método de la placa inclinada permitiendo que la suspensión corriera a lo largo de la placa hasta 1 cm del borde de la misma.

Las placas se incubaron entre 18-24 h a 37 °C con 5% de CO₂ y se realizó el conteo de viables mediante el empleo de un contador automático de colonias (Perceptive Instrument, UK) acoplado al programa Sorcerer (11). El título se definió como la mayor dilución del suero que causa lisis a ≥ 50% de colonias en relación con el promedio de colonias obtenido en los pozos de control suspensión.

Validación

Con el objetivo de demostrar mediante pruebas documentadas que este método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto para el propósito usado se llevó a cabo la validación del mismo, teniendo en cuenta la Regulación No. 41-2007: Validación de métodos analíticos del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (9), para lo cual se determinó la precisión, la cual incluye los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia, la exactitud, especificidad y robustez.

Repetibilidad: En el ensayo de repetibilidad se evaluaron tres sueros de humanos inmunizados con una vacuna polisacáridica de los serogrupos A, C, Y y W₁₃₅. Se determinó el título de anticuerpos bactericidas de cada una de las muestras de suero en seis repeticiones y se calculó la coincidencia entre las determinaciones.

Precisión Intermedia: Se siguió el mismo protocolo que para el ensayo de repetibilidad, pero este fue ejecutado por otro analista, en días diferentes y con otro lote de medio de cultivo. El criterio de aceptación para la prueba de precisión es que la coincidencia entre las repeticiones de una misma muestra sea ≥ 50%, es decir, la variación entre las réplicas no debe ser mayor de una dilución.

Exactitud: Para determinar la exactitud del ensayo, se comparó el título del control positivo, obtenido en seis repeticiones con el valor de título conocido para este suero frente a cada una de las cepas blanco representativas de los tres serogrupos. El valor obtenido no debe diferir en más de una dilución con respecto al valor reportado.

Especificidad: Para evaluar la especificidad se usaron tres sueros de individuos no vacunados contra *N. meningitidis*, cada uno de los cuales se tituló por duplicado. Para la aceptación de este indicador ninguna de las muestras evaluadas debería mostrar títulos de anticuerpos bactericidas.

Robustez: Fue evaluada con el objetivo de precisar si ligeros cambios introducidos deliberadamente en la técnica conllevan a grandes variaciones en los títulos de anticuerpos. Las variables incorporadas a este ensayo fueron: muestras de suero sin inactivar, tiempo de reacción de 90 min y uso de la solución de Hank sin BSA para el caso de los serogrupos C y W₁₃₅. Se empleó la muestra número 2 de título medio, usada en el ensayo de precisión.

Resultados y Discusión

Precisión: Para todos los serogrupos, tanto en el ensayo de repetibilidad como de precisión intermedia, ejecutados en diferentes días y por analistas diferentes y realizados con distintos lotes de medios de cultivo, la coincidencia fue del 100% (Tablas 1 y 2).

Los métodos fisicoquímicos tienen límites definidos aceptados para estos parámetros de prueba, pero los

Tabla 1. Resultados del ensayo de repetibilidad para los serogrupos A, C y W₁₃₅*

Muestra	Títulos bactericidas contra el serogrupo A			Títulos bactericidas contra el serogrupo C			Títulos bactericidas contra el serogrupo W ₁₃₅		
	Máx.	Mín.	Coinc.	Máx.	Mín.	Coinc.	Máx.	Mín.	Coinc.
No. 1	1024	1024	100	2048	2048	100	4096	4096	100
No. 2	256	256	100	128	128	100	256	256	100
No. 3	16	16	100	16	8	100	32	32	100

Max. = valor máximo. Min. = valor mínimo. Coinc. = coincidencia

Tabla 2. Resultados del ensayo de precisión intermedia para los serogrupos A, C y W₁₃₅*

Muestra	Títulos bactericidas contra el serogrupo A			Títulos bactericidas contra el serogrupo C			Títulos bactericidas contra el serogrupo W ₁₃₅		
	Máx.	Mín.	Coinc.	Máx.	Mín.	Coinc.	Máx.	Mín.	Coinc.
No. 1	1024	1024	100	4096	2048	100	4096	4096	100
No. 2	256	256	100	256	256	100	512	512	100
No. 3	8	8	100	8	8	100	128	64	100

Max.=valor máximo. Min.=valor mínimo. Coinc.=coincidencia

bioensayos, al utilizar animales o células que de por sí son variables, pueden tener límites de aceptación más amplios. Las pruebas con células son aquellas en las que el producto provoca una respuesta cuantificable como puede ser: aglomeración de células, fusión celular, generación de una sustancia química específica y detectable o lisis celular, como en el ensayo bactericida. Debemos destacar que a pesar de la variabilidad descrita en estos ensayos, la precisión del ensayo bactericida para los serogrupos A, C y W₁₃₅ de *N. meningitidis* mostró una óptima repetibilidad y precisión intermedia, adecuada para el fin previsto.

Exactitud: Para el serogrupo A, los títulos que se obtuvieron para el suero control positivo evaluado en días diferentes, oscilaron entre 2048 y 8192, es decir, mostraron una diferencia no mayor de una dilución con respecto al título esperado para este suero frente a cepas de este serogrupo. Frente a la cepa C11 el valor reportado fue de 2048, donde se obtuvieron valores entre 1024 y 4096. En las réplicas del control positivo realizadas para el serogrupo W₁₃₅ utilizando como blanco la cepa S4383, se obtuvo en todos los casos un título de 512, que es el reportado para este suero. Podemos concluir que la exactitud del ensayo fue excelente contra todos los serogrupos (Tabla 3).

Debemos destacar que al ser el ensayo bactericida una técnica semicuantitativa, donde los resultados se expresan como la mayor dilución que causa el efecto evaluado, son aceptadas las diferencias de una dilución entre réplicas. Por lo que los indicadores de precisión y exactitud encontrados son muy favorables.

Especificidad: Para ninguno de los tres sueros de los individuos sanos, no vacunados contra *N. meningitidis*, se obtuvo título de anticuerpos bactericidas, lo que demuestra que el ensayo es específico para reconocer a esta especie bacteriana o a alguno de sus antígenos; además, en todos los casos, el control negativo empleado mostró títulos inferiores a cuatro que es la primera dilución realizada.

Robustez: Se han desarrollado diferentes protocolos para demostrar la presencia de anticuerpos bactericidas, pero

todos ellos contienen los tres elementos fundamentales: bacteria, anticuerpo y complemento.

Los ensayos disponibles en la actualidad difieren en el número de células por pozo, amortiguador, crecimiento de la cepa blanco, tiempo de incubación, fuente de complemento, concentración de complemento y dilución inicial del suero (12). Por este motivo se escogieron algunas de estas variables, para demostrar que pequeños cambios introducidos en la técnica de manera deliberada, o que pudieran ocurrir accidentalmente durante la realización de la misma, no logran influir en los resultados. Se observó que generalmente se repitieron los mismos títulos y en algunos casos hubo una diferencia de tan solo una dilución (Tabla 4).

Los resultados obtenidos demostraron que para las condiciones evaluadas, no se modificaron los títulos de anticuerpos bactericidas. Podemos concluir que el ensayo bactericida para la determinación de anticuerpos séricos contra *N. meningitidis* de los serogrupos A, C y W₁₃₅ en suero humano mostró precisión, exactitud, especificidad y robustez dentro de los límites de aceptación para este tipo de ensayo y en concordancia con el objetivo del mismo.

Referencias

1. Goldschneider I, Gotschlich E, Artenstein M. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 1969;129:1307-26.
2. Sadarangani M, Pollard A. Serogroup B meningococcal vaccines an unfinished story. *Lancet Infect Dis* 2010;10:112-4.
3. Borrow R, Balmer P, Miller E. Meningococcal surrogates of protection-serum bactericidal antibody activity. *Vaccine* 2005;23:2222-7.
4. Zollinger W, Moran E, Schmiel D. Characterization of an Antibody Depletion Assay for Analysis of Bactericidal Antibody Specificity. *Clin and Vaccine Immunol* 2009;16:1789-95.
5. Wedege E, Kuipers B, Bolstad K, van Dijken H, Oddvar L, Vermont C, et al. Antibody Specificities and Effect of Meningococcal Carriage in Icelandic Teenagers Receiving the Norwegian Serogroup B Outer Membrane Vesicle Vaccine. *Infect and Immunity* 2003;71:3775-81.
6. Mountzouros K, Howell A. Detection of Complement-Mediated Antibody-Dependent Bactericidal Activity in a Fluorescence-

Tabla 3. Resultados del ensayo de exactitud para los serogrupos A, C y W₁₃₅*

Réplicas	Título del control positivo		
	Serogrupo A	Serogrupo C	Serogrupo W ₁₃₅
1	4096	4096	512
2	4096	4096	512
3	4096	2048	512
4	4096	1024	512
5	2048	1024	512
6	8196	1024	512
Valor de Referencia	4096	2048	512

Tabla 4. Resultados del ensayo de robustez para los serogrupos A, C y W₁₃₅

Muestra	Tiempo reacción 90 min.			Muestras de suero sin calentar			HBSS sin BSA		
	Máx.	Mín.	Coinc.	Máx.	Mín.	Coinc.	Máx.	Mín.	Coinc.
A	256	256	100	256	256	100	nd	nd	nd
C	128	128	100	256	256	100	128	128	100
W ₁₃₅	512	256	100	512	256	100	512	256	100

Max. = valor máximo. Min. = valor mínimo. Coinc. = coincidencia nd: no determinado

Based Serum Bactericidal Assay for Group B *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microb* 2000;38:2878-94.

- Camaraza M, Ochoa R, Arnet A, Sotolongo F, Martínez I, Cuevas I, et al. Inmunogenicidad inducida por la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC® contra la cepa de *N. meningitidis* ATCC C11 en adolescentes después de 12 años de vacunados. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2004;56(1):26-30.
- Borrow R, Aaberge I, Santos G, Eudey T, Oster P, Glennie A, et al. Interlaboratory Standardization of the Measurement of Serum Bactericidal Activity by Using Human Complement against Meningococcal Serogroup B, Strain 44/76-SL, before and after Vaccination with the Norwegian MenBvac Outer Membrane Vesicle Vaccine. *Clin and Diag Lab Immun* 2005;12:970-6.
- Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. República de Cuba. Ministerio de Salud Pública. Regulación No. 41-2007. Validación de métodos analíticos. Ciudad de la Habana: CECMED; 2007.
- Joseph H, Balmer P, Bybel M, Papa T, Ryall R, Borrow R. Assignment of *Neisseria meningitidis* Serogroups A, C, W₁₃₅ and Y Anticapsular Total Immunoglobulin G (IgG), IgG1 and IgG2 Concentrations to Reference Sera. *Clin and Diag Lab Immun* 2004;11:1-5
- Hellerud BC, Aase A, Herstad TK, Meyer L, Kristiansen LH, Siebke A, et al. Critical Roles of Complement and Antibodies in Host Defense Mechanisms against *Neisseria meningitidis* as Revealed by Human Complement Genetic Deficiencies. *Infect Immun* 2010;2: 802-9.
- Malanska S, Gheesling L, Libutti D, Donaldson K, Harakeh H, Dykes J. Standardization and multilaboratory comparison of *N. meningitidis* serogroups A and C serum bactericidal assay. *Clin and Diag Lab Immun* 1997;4:156-67.

Validation of the serum bactericidal assay for *Neisseria meningitidis* serogroups A, C and W₁₃₅*

Abstract

Serum bactericidal assay is considered the most efficient tool for measuring the immunity status in people vaccinated against *N. meningitidis* and it is the analytical support for the development of polysaccharide vaccines. Good Manufacturing Practice and Quality Control of Pharmaceutical Products regulate the validation procedure for manufacturing process and the analysis and control methods, especially for bioassays that are more variable than physicochemical assays. For that reason, the validation of bactericidal assay for the tilt method was carried out by the determination of precision, specificity, accuracy and robustness. The results were in the range of acceptance criteria, that is why this assay is considered suitable for the evaluation of the immune response induced by A, C and W₁₃₅ polysaccharide vaccines against meningococcal meningitis.

Keywords: *N. meningitidis*, bactericidal assay, validation