

TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS EN EL DESARROLLO CLÍNICO DE VACUNAS

Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze

Doctor en Ciencias Médicas

Médico especialista de I y II Grado en Inmunología

Investigador Titular del Instituto Finlay

Profesor Titular en la Universidad Médica de La Habana



La Habana, 2013

Edición al cuidado de: Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze
Redacción y corrección: Lic. Virginia Betancourt López
Diseño de cubierta: Lic. Mauricio Zayas Lima
Lic. Vivian Polanco Chang

Primera edición, 2013 (versión electrónica)

© Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze
© Sobre la presente edición:
Finlay Ediciones, 2013

ISBN: 978-959-7076-51-3

FINLAY EDICIONES
Ave. 27 No. 19805,
La Coronela, La Lisa,
La Habana, Cuba
Web: www.finlay.sld.cu/ediciones.htm

Contenido

Prólogo

Sección I. Estandarización y validación de técnicas inmunoenzimáticas / 1

Capítulo 1. Características de los ensayos inmunoenzimáticos / 3

Capítulo 2. Estandarización de técnicas inmunoenzimáticas / 15

Capítulo 3. Validación de inmunoensayos cuantitativos y cualitativos / 25

Sección II. Ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos / 43

Capítulo 4. Generalidades sobre vacunas / 45

Capítulo 5. Evaluación de la inmunogenicidad de vacunas / 55

Capítulo 6. Estudios inmunoepidemiológicos en vacunología / 65

Epílogo / 77

Anexo 1. Glosario / 79

Anexo 2. Otros inmunoensayos en vacunología clínica / 85

Prólogo

Los anticuerpos inducidos por vacunas o presentes en la población en estudios inmunoepidemiológicos, pueden ser medidos por técnicas in vitro no funcionales. Entre estos ensayos, el ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay) resulta la técnica de elección para determinar el grado de protección o la seroconversión inducida por una vacuna; también sirve para evaluar la inmunidad poblacional, lo que está dado por su sensibilidad y detectabilidad, su elevada precisión y exactitud, y con ella pueden procesarse lo mismo un número pequeño que grande de muestras.

Es necesario que los profesionales sepan seleccionar el ELISA apropiado, si no están disponibles desarrollarlos, e interpretar los resultados.

Este libro introduce a los lectores en los principales aspectos relacionados con la estandarización y validación de técnicas inmunoenzimáticas, temas poco abordados en la literatura, y su aplicación en los ensayos clínicos de vacunas preventivas y estudios inmunoepidemiológicos. La metodología propuesta también es útil en otras investigaciones, básicas o aplicadas, en los que se empleen los inmunoensayos como herramientas analíticas.

Hemos tratado de preparar una monografía didáctica, que abarque en sus secciones tanto temas básicos como aplicados. Incluimos un glosario para facilitar la comprensión de su contenido. Consideramos que esta obra pudiera ser útil, no solo a los profesionales que trabajan en este campo, sino a otros especialistas y estudiantes de pregrado o posgrado, interesados en algunos de los aspectos que en el mismo se abordan. Si así fuera, nos sentiríamos satisfechos.

Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze

Sección I

Estandarización y validación de técnicas inmunoenzimáticas

Capítulo 1

Características de los ensayos inmunoenzimáticos

Introducción

Los anticuerpos inducidos por vacunas o presentes en la población según estudios inmunoepidemiológicos, pueden ser medidos por técnicas in vivo e in vitro. Las pruebas in vivo miden directamente la actividad biológica en animales de laboratorio; son sensibles y específicas, pero caras; requieren personal altamente entrenado durante mucho tiempo, un gran número de animales y un volumen relativamente grande de suero para su ejecución. Estos estudios no se recomiendan en humanos por motivos éticos.

La interacción entre los anticuerpos y los antígenos puede ser evaluada por diferentes ensayos in vitro. Los funcionales o biológicos, aunque menos engorrosos que los in vivo, resultan laboriosos, pero tienen la virtud de correlacionarse con protección; entre estos tenemos el ensayo bactericida en suero y el de actividad opsonofagocítica. Los no funcionales son simples, sensibles, rápidos y menos caros; sin embargo, no evidencian directamente las funciones biológicas de los anticuerpos. Por lo tanto, los resultados de estas técnicas deben ser interpretados cuidadosamente y verificados contra los métodos in vivo cuando estén disponibles, o evaluar su respuesta en estudios clínicos de eficacia vacunal o seroepidemiológicos.

Entre los ensayos in vitro no funcionales para la detección de anticuerpos, el ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay) resulta la técnica de elección; su sensibilidad y detectabilidad son semejantes al radioinmunoanálisis, se caracteriza por su precisión y exactitud y con ella puede procesarse lo mismo un número pequeño que grande de muestras, sin los riesgos que implica el empleo de material radioactivo.

Técnicas inmunoenzimáticas

Para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo se han usado diferentes métodos; de los basados en la inmunoprecipitación y la aglutinación, que adolecen de insuficiente sensibilidad y detectabilidad, se pasó a los que emplean marcadores para detectar dicha reacción. Se han usado isótopos radioactivos, compuestos fluorescentes y quimioluminiscentes, marcadores electroactivos, lantánidos, radicales libres estables, partículas de látex, liposomas, colorantes, coloides, bacteriófagos y enzimas, entre otros.

Los ensayos que usan como marcador enzimas (técnicas inmunoenzimáticas, inmunoensayos enzimáticos o ensayos inmunoenzimáticos) presentan extraordinarias ventajas aún no superadas, tales como:

- Elevada sensibilidad, detectabilidad y especificidad.
- Alta precisión y exactitud.
- Equipamiento relativamente barato.

- Procedimientos técnicos rápidos y sencillos.
- Reactivos de larga vida.
- Gran variedad de sustratos y cromógenos que incrementa su versatilidad.

Las técnicas inmunoenzimáticas tienen su origen en el radioinmunoanálisis; en lugar de los peligrosos radioisótopos de corta vida media, se emplean enzimas como sustancias marcadoras. Surgieron a mediados de la década de los 60 del pasado siglo para la identificación y localización intracelular de antígenos y han tenido un auge vertiginoso, su uso se ha ampliado para la detección de un diverso número de antígenos y anticuerpos.

Estos ensayos se apoyan en tres características biológicas fundamentales: la extraordinaria especificidad de los anticuerpos, el elevado poder catalítico y la alta especificidad de las enzimas. Mediante la combinación de la reacción inmunológica con un indicador altamente sensible, el débil efecto inmunológico se ve reforzado por la amplificación enzimática, de forma que se consigue una elevada sensibilidad y detectabilidad. Si a esto le añadimos la especificidad de la reacción inmunológica, se podrá comprender su aplicabilidad en el diagnóstico clínico. Gracias a ello se han podido estudiar: hormonas, fármacos, péptidos y proteínas, vitaminas, otros analitos y, por supuesto, anticuerpos dirigidos contra los propios constituyentes del organismo (autoanticuerpos), contra diversos microorganismos o contra inmunógenos vacunales.

La reacción antígeno-anticuerpo se detecta generalmente mediante un cambio de color o la emisión de luz, producidos por la interacción de la enzima y su sustrato. Ambos efectos son cuantificables y proporcionales a la intensidad de la interacción. El uso de sustratos de depósito permite la visualización de los resultados y es muy utilizado sobre membranas.

Enzimas y sustratos

La popularidad de las enzimas como elemento marcador se debe a su enorme poder catalítico, su alta especificidad, el amplio espectro de sustratos que pueden usarse y la gran estabilidad de los conjugados.

Existen determinados criterios de selección para una enzima marcadora:

- Económica y alto grado de pureza en su obtención.
- Presencia de grupos reactivos para la unión covalente.
- La conjugación debe ser sencilla y los conjugados activos y estables.
- Estable en forma libre y conjugada.
- Elevada actividad catalítica.
- Soluble.
- Sencilla, sensible y mensurable.
- No debe hallarse en el medio a examinar.
- Los elementos procedentes del material a examinar no deben interferir con la prueba.
- La actividad debe conservarse en las condiciones de la prueba.

- Disponibilidad de sustratos baratos y no tóxicos que permitan la formación de productos estables.
- En los ensayos heterogéneos debe ser mínima la influencia de la fase sólida sobre la actividad enzimática.
- Las enzimas usadas en los ensayos homogéneos deben conjugarse fácilmente cerca del sitio activo sin que se altere su actividad.

Las enzimas más usadas son: en los ensayos heterogéneos: peroxidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa oxidasa, ureasa, glucoamilasa, acetilcolinesterasa, glutamato descarboxilasa y anhidrasa carbónica. Entre ellas, la primacía la tienen las dos primeras. En los ensayos homogéneos: glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, lisosima, hexoquinasa, β -galactosidasa, amilasa y fosfolipasa C.

La peroxidasa es la enzima más empleada; son hemoproteínas que transfieren el hidrógeno de moléculas donadoras al peróxido de hidrógeno. Se conjuga fácilmente, tiene una elevada actividad catalítica y un gran número de cromógenos que permiten la lectura fotométrica: 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina, orto-fenilendiamina y 2,2'-azino-bis (ABTS), y con ellos se alcanza una elevada sensibilidad y detectabilidad. Los de depósito: 4-cloro-1-naftol, 3-amino-9-etilcarbazol y 3,3'-diaminobencidina, son muy apropiados para la visualización de los resultados. Aunque es posible la lectura por fluorescencia con el ácido para-hidroxifenil acético y el ácido 3,4 hidroxifenil propiónico, no es habitualmente empleada por no representar, en este caso, una ventaja adicional con respecto a los sustratos cromogénicos.

La fosfatasa alcalina es de más difícil conjugación; sin embargo, sus conjugados son muy estables. Hidroliza numerosos ésteres de fosfato, lo que le permite tener un gran número de sustratos, entre ellos: el cromogénico para-nitrofenil fosfato, el sustrato fluorogénico, 4-metil umbeliferil fosfato, y el de depósito 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato con azul de nitrotetrazolio. Aunque la sensibilidad con sustratos cromogénicos es inferior a la que puede alcanzarse con la peroxidasa, la fosfatasa alcalina reúne otras ventajas, es menos dependiente de factores interferentes como la hemoglobina en la muestra, y la lectura, en la mayor parte de los ensayos, puede hacerse sin que se requiera detener la reacción.

Como hemos visto, la actividad enzimática puede estimarse mediante fluorimetría, luminometría o colorimetría, como medida de los productos solubles formados, o mediante sustratos de depósito. Los productos fluorescentes y luminiscentes brindan generalmente una superior sensibilidad, detectabilidad y permiten una mayor dilución de los inmunorreactantes, así como una reducción del tiempo de ejecución de los ensayos y del volumen de reacción.

Sin embargo, la colorimetría sigue siendo el método más empleado debido a la posibilidad de evaluación visual, un equipamiento más sencillo y una mayor estabilidad de los productos formados; a esto puede añadirse que en la evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por vacunas o en estudios seroepidemiológicos, habitualmente es suficiente la sensibilidad y detectabilidad que se alcanzan con la lectura fotométrica. De ahí que no se requiera tampoco la amplificación de la respuesta con ciclos enzimáticos, como los redox de alcohol deshidrogenasa/diaforasa, utilizando como enzima inicial la fosfatasa alcalina y el NADP como sustrato.

No obstante, el uso de sustratos fluorogénicos, luminométricos u otros métodos de amplificación, deben tenerse en cuenta cuando se requiera una elevada sensibilidad y detectabilidad, como pudiera ser la evaluación de la inmunidad en mucosas u otros líquidos corporales con baja concentración de anticuerpos.

Clasificación de los ensayos inmunoenzimáticos

Existen diferentes criterios de clasificación para estos ensayos: según la naturaleza del sistema pueden ser competitivos o no, conforme a la naturaleza del conjugado se han identificado los ensayos con antígenos o anticuerpos marcados. Sin embargo, la clasificación más usada se basa en si se requiere o no de procedimientos para separar las fases del ensayo; de acuerdo con este criterio los inmunoensayos enzimáticos se clasifican respectivamente en heterogéneos y homogéneos. Es preferible hablar de separación de fases en lugar del empleo o no de lavados, ya que existen otros métodos, como los basados en principios inmunocromatográficos, lo que nos puede llevar a un error de clasificación.

Inmunoensayos homogéneos

Estos inmunoensayos se ejecutan sin una fase sólida y no requieren la separación entre los reactantes enlazados y libres. Su principio se basa en una inhibición o activación de la reacción enzimática por el complejo antígeno-anticuerpo (Figura 1,1).

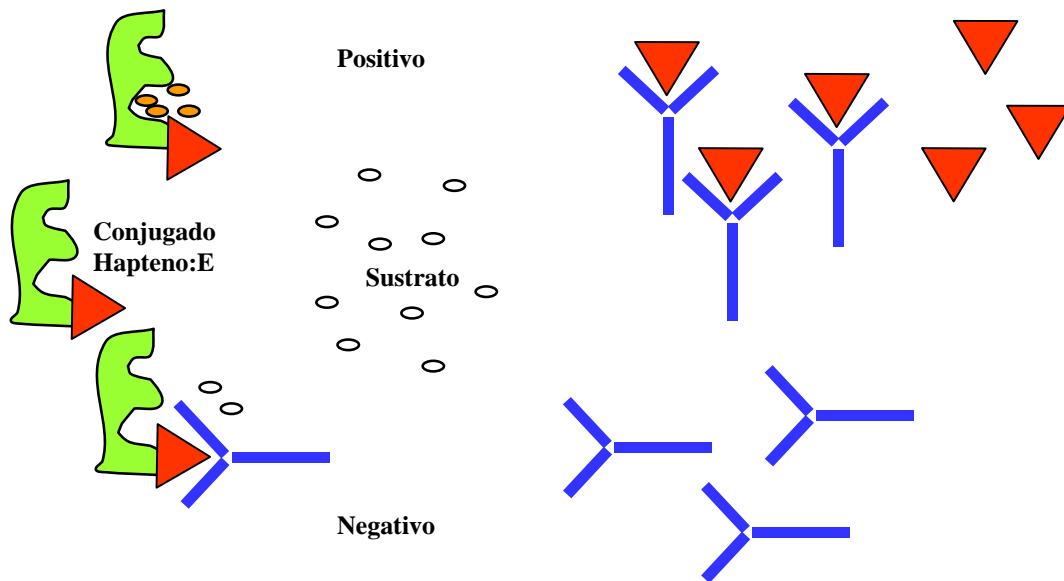


Figura 1,1. Ensayo homogéneo.

Pueden dividirse en competitivos y no competitivos. En los primeros, el clásico conjugado antígeno-enzima es modulado por la reacción antígeno-anticuerpo, o por impedimento estérico o cambio en la configuración de la enzima. En lugar de la enzima puede conjugarse

el sustrato; en este caso, el anticuerpo bloqueará su degradación. En ambos procedimientos el antígeno libre disminuirá esta modulación.

Existen además otras múltiples variantes, en una de ellas se emplean conjugados antígeno-cofactor y la actividad enzimática es bloqueada por el anticuerpo, a menos que haya suficiente antígeno libre. Otra variante se fundamenta en la inhibición enzimática inducida por un conjugado avidina-hapteno al conjugado biotina-enzima y su bloqueo por la acción de anticuerpos. En todo caso, estas y otras variantes responden a los principios expuestos para estos ensayos.

En los no competitivos, la distinción entre los elementos libres y enlazados se logra usando diferentes conjugados, dirigidos contra distintos epítomos del antígeno, y el producto de una de las enzimas seleccionadas es el sustrato para la otra. No han tenido un amplio uso por no constituir una opción para los ensayos heterogéneos.

En los ensayos homogéneos, si bien queda eliminada la fase de separación, se introduce el riesgo de que los componentes de la muestra puedan interferir en la actividad enzimática. Sin embargo, la mayor limitante resulta que son considerablemente menos sensibles que los heterogéneos, lo que no los convierte en una alternativa real para la detección de anticuerpos. Estos ensayos se prestan principalmente para sustancias de bajo peso molecular (haptenos) y de concentración relativamente alta, por ejemplo, farmacovigilancia de drogas.

Inmunoensayos heterogéneos

En el inmunoensayo enzimático heterogéneo, conocido con el nombre ELISA, siempre se realiza una separación entre el inmunocomplejo formado sobre la fase sólida y las biomoléculas no fijadas.

Esta separación puede hacerse por simple aspiración y lavado, lo que permite eliminar todos los componentes de la muestra que podrían interferir en el ensayo. La separación entre los inmunorreactantes libres y fijados puede hacerse también por sedimentación, captura de los inmunocomplejos de interés, filtración, difusión radial y otros principios inmunocromatográficos que han servido de base a ensayos rápidos, sencillos y que no requieren equipamiento, muy apropiados para el diagnóstico individual. No obstante, los lavados continúan siendo el procedimiento de elección y son necesarios entre cada paso de reacción, lo que obstaculiza la automatización. Esta limitante se ha superado con el uso de ensayos, cuando es posible, en un solo paso, en el que se añaden simultáneamente los inmunorreactantes, dirigidos contra diferentes epítomos; de esta forma se requiere lavar tan sólo en el paso previo al sustrato.

La técnica ELISA se fundamenta en la premisa de que luego de acoplar antígenos solubles o anticuerpos a una matriz sólida insoluble, estos retienen la actividad inmunológica y en que estas biomoléculas también pueden unirse a una enzima, reteniendo el conjugado resultante, tanto la actividad enzimática como inmunológica.

Además de haptenos, en el ELISA también es posible determinar moléculas de alto peso molecular. Sin embargo, su principal ventaja está dada en su alto grado de sensibilidad, detectabilidad, precisión y exactitud, lo que hace que los inmunoensayos enzimáticos según el principio ELISA, puedan equipararse a los radioinmunoensayos, sin sus desventajas.

Clasificación de los ELISAs

Existen diferentes clasificaciones para los ELISAs, algunas de ellas contradictorias, aunque basadas fundamentalmente en los principios de reacción. Generalmente se proponen una serie de métodos básicos a partir de los cuales se derivan una serie de variantes. Los ELISAs pueden ser competitivos o no competitivos.

En los ensayos competitivos (Figura 1,2), los anticuerpos o los antígenos son inmovilizados sobre la fase sólida y su unión con el conjugado antígeno-enzima o anticuerpo-enzima, es inhibida por la presencia de analito no marcado en la muestra. Las incubaciones entre muestras y conjugados pueden ser simultáneas o secuenciales. Esta última variante no es estrictamente competitiva, con ella se alcanza una mayor detectabilidad y es recomendada cuando se quieren detectar anticuerpos de baja afinidad contra los antígenos de captura.

En general, la sensibilidad y detectabilidad de estos ensayos es inferior a otros ELISAs que luego describiremos.

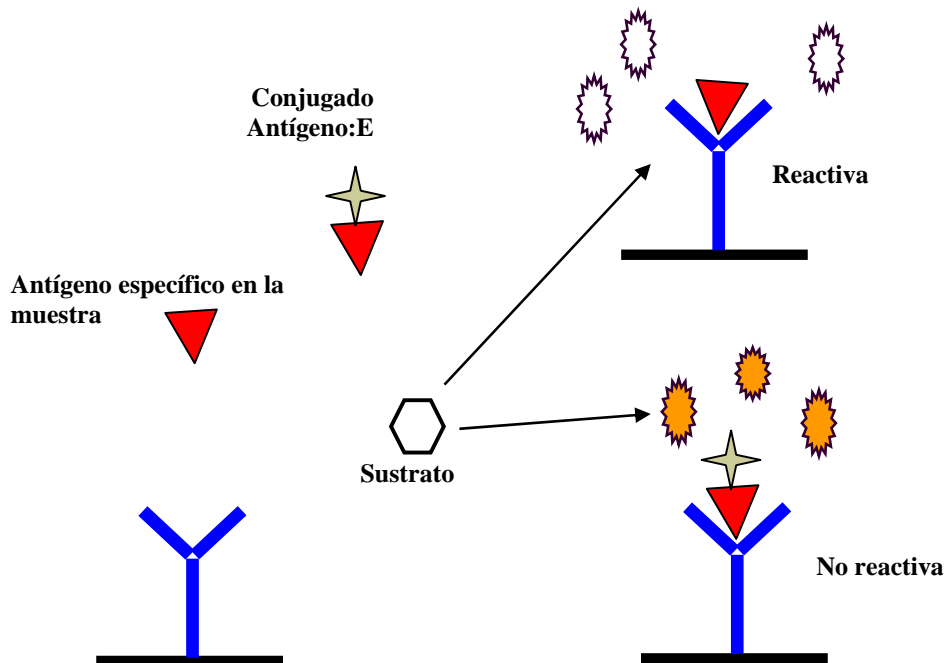


Figura 1,2. Ensayo competitivo de antígenos.

Algunos autores consideran el principio de inhibición (Figura 1,3) como no competitivo, lo que es cuestionable, ya que aunque el antígeno en solución reaccione con los anticuerpos libres, la reacción puede desplazarse hacia el inmunorreactante de captura, sobre todo cuando es simultánea.

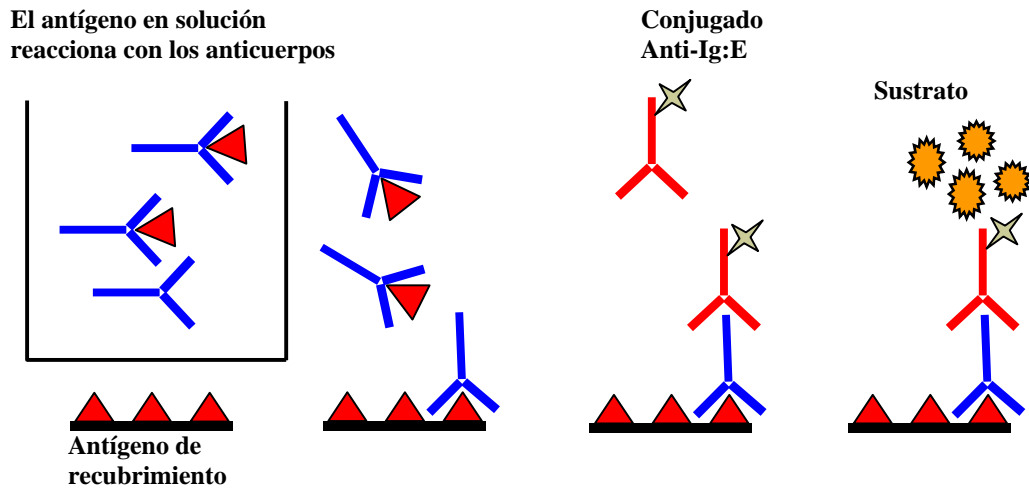


Figura 1,3. Ensayo de inhibición.

Los ensayos de inhibición de antígeno (Figura 1,4), son útiles para la evaluación de la respuesta inmune humoral, al favorecer la interacción antígeno-anticuerpo que se realiza en la fase líquida, correlacionando habitualmente bien con los ensayos in vivo; no obstante, son más laboriosos, sobre todo cuando se requiere procesar un gran número de muestras.

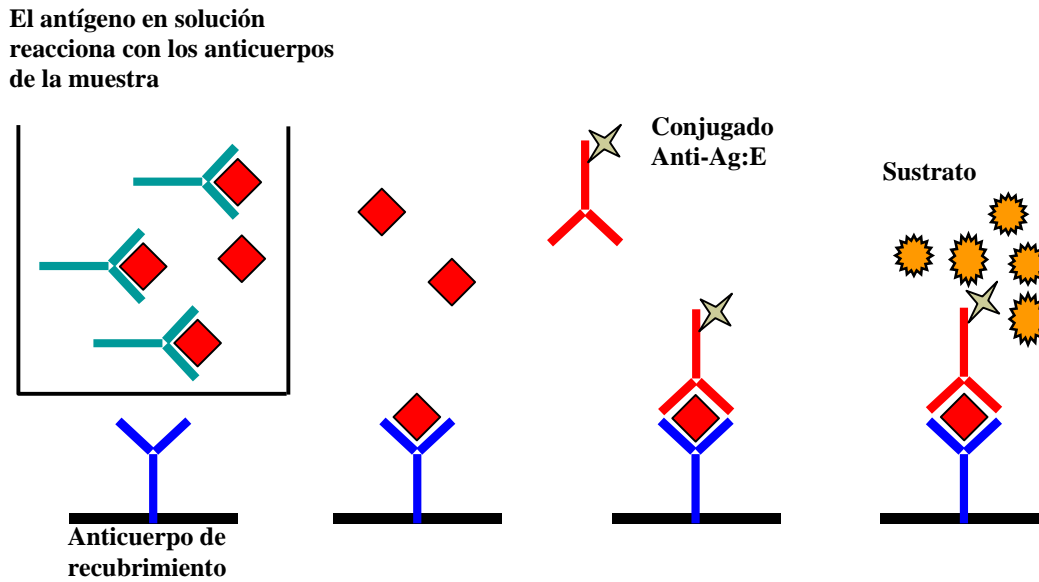


Figura 1,4. Ensayo de inhibición de antígeno.

Los ensayos heterogéneos no competitivos pueden subdividirse de acuerdo al inmunorreactivo inmovilizado, serán, por tanto, ensayos de captura de anticuerpos o de antígenos. Entre los primeros se destaca el principio de ensayo indirecto, en el cual los antígenos capturan a los anticuerpos y la reacción se evidencia por el conjugado anti-inmunoglobulina-enzima, o proteína A-enzima (Figura 1,5).

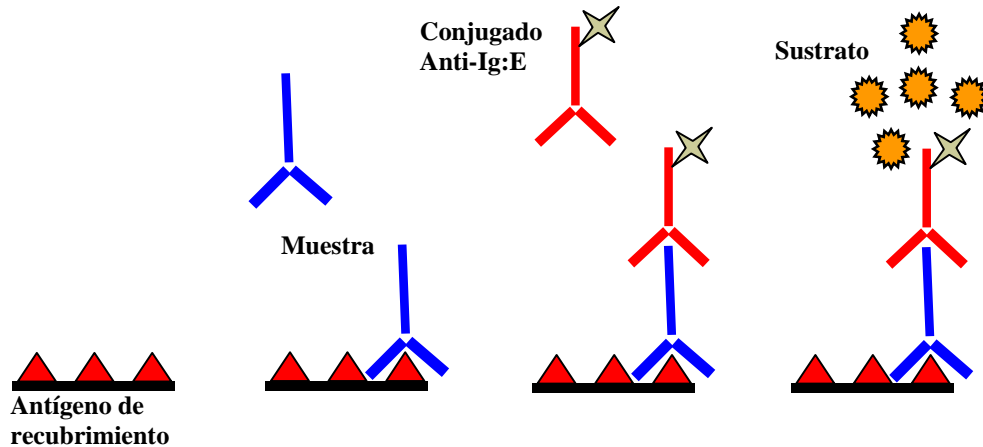


Figura 1,5. ELISA indirecto.

La cantidad de enzima enlazada indica la cantidad de anticuerpos en el suero y puede ser medida por la degradación de su sustrato. No obstante, debe tenerse en cuenta que su correlación con los ensayos in vivo se afecta cuando la concentración de anticuerpos es baja, ya que el ELISA indirecto tiende a sobrestimar los sueros de bajos títulos, probablemente esto se deba a la presencia de inmunoglobulinas inespecíficas o anticuerpos de baja afinidad. El empleo de iones caotrópicos en el diluyente de la muestra, o en el paso de lavado, posibilita la detección de anticuerpos de alta afinidad, mejorando su correlación con los ensayos in vivo e in vitro funcionales. Estos ensayos han sido denominados como “ELISA de avidéz”.

El ELISA indirecto es el de elección para detectar anticuerpos de clase IgG o IgA. La IgM puede estudiarse previa depleción de los anticuerpos IgG con antisueros anti-IgG cadena γ , aunque este isotipo debe evaluarse preferentemente con ensayos de captura IgM. Los ensayos indirectos presentan una alta detectabilidad que depende de la densidad de epítomos de relevancia diagnóstica presentes en la fase sólida.

El ELISA tipo sándwich doble anticuerpo es el ejemplo clásico de métodos para la detección de antígenos, el primer anticuerpo captura el antígeno de la muestra que es detectado a través del conjugado anticuerpo-enzima, o amplificado con un conjugado dirigido contra el segundo anticuerpo (sándwich doble anticuerpo modificado) u otros procedimientos (Figura 1,6).

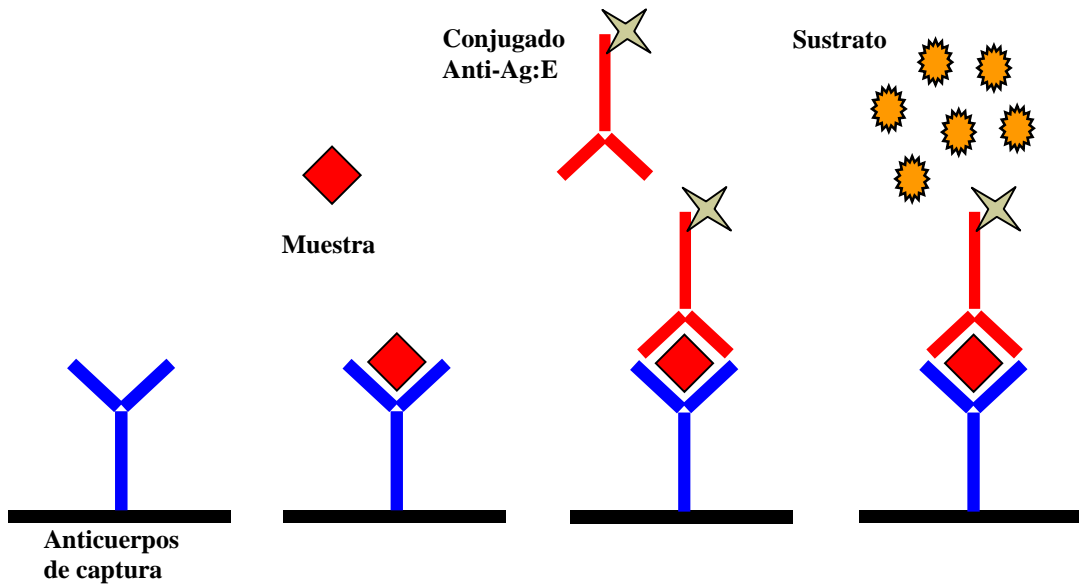


Figura 1,6. ELISA tipo sándwich doble anticuerpo.

Los ensayos sándwich doble antígeno son usados para la detección de anticuerpos y son muy útiles para la evaluación de la respuesta inmune inducida por vacunas (Figura 1,7), tanto en ensayos clínicos como en estudios seroepidemiológicos. Es la técnica de elección en la evaluación de la vacuna recombinante de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

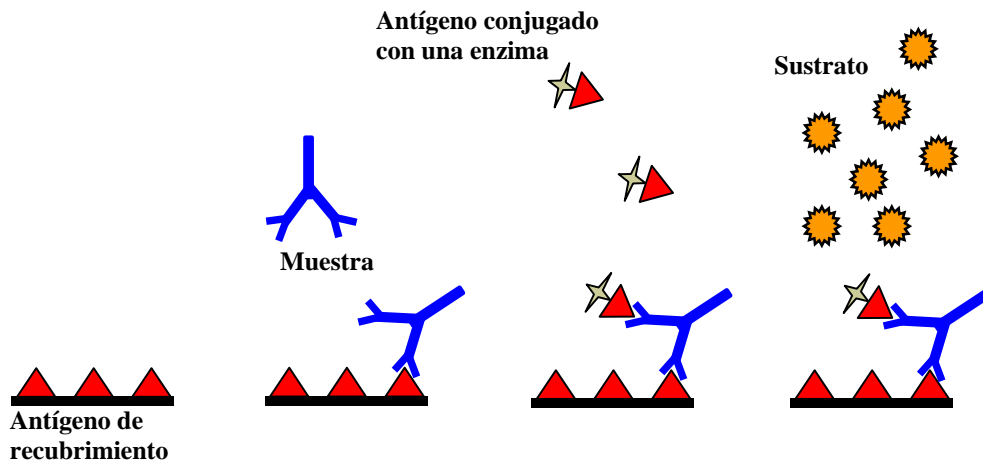


Figura 1,7. ELISA tipo sándwich de doble antígeno.

En estos ensayos, al igual que en los indirectos, los antígenos capturan los anticuerpos, pero en esta ocasión en lugar de un conjugado anti-inmunoglobulina-enzima, usamos

antígeno-enzima, de esta forma se alcanza la máxima sensibilidad y detectabilidad al no ser necesario diluir las muestras; sin embargo, detectamos todas las clases de inmunoglobulinas, lo que en ocasiones no es conveniente.

En general, los ensayos sándwich son más apropiados para la automatización de los ELISAs, ya que puede disminuirse un paso de reacción añadiendo simultáneamente muestras y conjugado, aunque hay que prever las posibles interferencias por bloqueo de los sitios de unión de los inmunorreagentes de captura o del conjugado, en el caso de elevadas concentraciones de antígenos o anticuerpos en la muestra.

Los ensayos de captura IgM deben usarse si queremos estudiar, mediante la detección de IgM, la respuesta primaria inducida por inmunógenos vacunales timodependientes, o la producción de IgM en los timoindependientes; estos ensayos son también usados en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Los anticuerpos anti-IgM inmovilizados capturan la IgM de la muestra, que a su vez reacciona con el antígeno conjugado con una enzima, o sin marcar, lo que requiere de un paso adicional con un anticuerpo marcado. De esta forma se verifica si están presentes los anticuerpos específicos para el isotipo capturado (Figura 1,8).

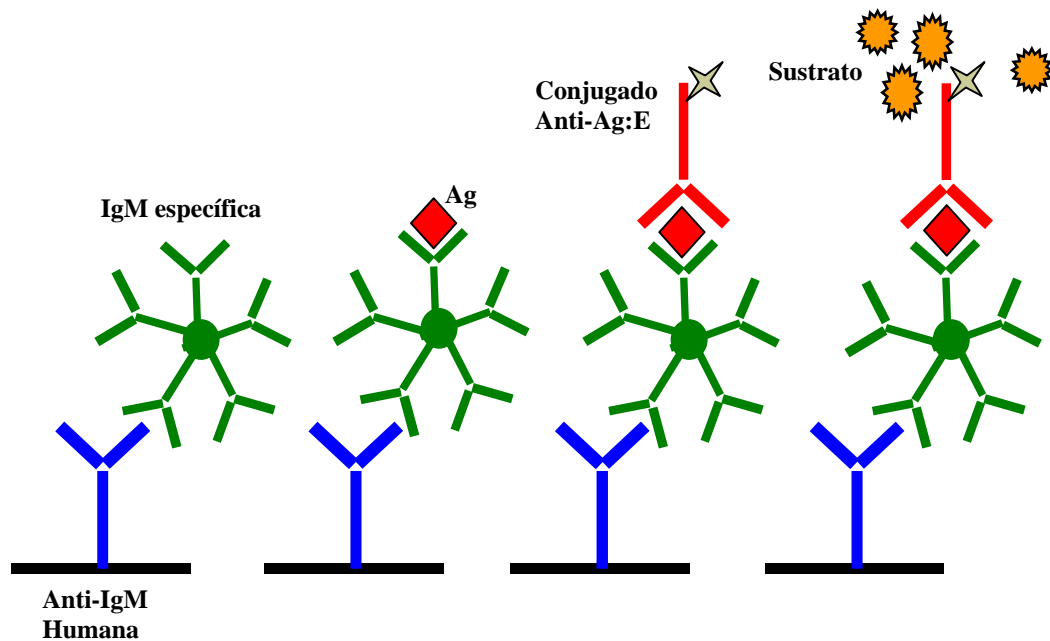


Figura 1,8. Ensayo de captura IgM.

La detectabilidad de todos estos ensayos puede incrementarse usando métodos de amplificación no inmunológicos (por ejemplo el sistema avidina-biotina y cascadas enzimáticas) o inmunológicos (como el sistema peroxidasa-antiperoxidasa).

Conclusión

La selección de uno u otro principio depende principalmente de los propósitos del ensayo, la disponibilidad y calidad de los reactivos, su utilización en la práctica y la necesidad o no de su ajuste a un formato de estuche de reactivos. Para evaluar la inmunogenicidad de una vacuna o realizar estudios seroepidemiológicos de enfermedades inmunoprevenibles, deben valorarse los ensayos sándwich doble antígeno o los de inhibición, cuyas ventajas hemos descrito, aunque es insustituible el ensayo indirecto con el uso de conjugados específicos de clase, sobre todo IgG para estudiar la respuesta secundaria, e IgA cuando se requiera evaluar la inmunidad de mucosa.

Bibliografía

1. Avrameas S. Indirect Immunoenzyme Techniques for the Intracellular Detection of Antigens. *Immunochemistry* 1969;6:825-31.
2. Engvall E. and Perlman P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labelled Anti-Immunoglobulin in Antigen Coated Tubes. *J Immunol* 1972;109:129-35.
3. Harlow E, Lane D, editors. Immunoassays. En: *Antibodies. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998. p.553-612.
4. Johannsson A, Stanley CJ, Self CH. A Fast Highly Sensitive Colorimetric Enzyme Immunoassay System Demonstrating Benefits of Enzyme Amplification in Clinical Chemistry. *Clin Chim Acta* 1985;148:119-24.
5. Ochoa R. Métodos para la evaluación de anticuerpos inducidos por vacunas. Capítulo 2. En: *Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas*. Ciudad de la Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.12-30.
6. Ochoa R. Principales técnicas de laboratorio para explorar la inmunidad poblacional. Capítulo 5. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.39-48.
7. Ochoa R. *Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos*. (Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias Médicas). Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana; 2002.
8. Oellerich M. Enzyme Immunoassay: A Review. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984;22:895-904.
9. Porstmann B, Porstmann T, Nugel E, Evers U. Which of the Commonly Used Marker Enzymes Gives the Best Results in Colorimetric and Fluorimetric Enzyme Immunoassays: Horseradish Peroxidase, Alkaline Phosphatase or Beta-Galactosidase?. *J Immunol Methods* 1985;79:27-37.
10. Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF. Homogeneous Enzyme Immunoassay. A New Immunochemical Technique. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;47:846-51.
11. Tijssen P. Outline of the Strategies for Enzyme Immunoassays. En: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. London: Elsevier; 1993 p.9-20.
12. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Nuffield Laboratories of Comparative Medicine. London: Dynatech Europe; 1979.
13. World Health Organization. Clinical evaluation of vaccines. Part B. En: *Annex 1. Guidelines on Clinical Evaluation of Vaccines. Regulatory Expectations*. Geneva: The World Health Organization; 2004. p.55-92.

Capítulo 2

Estandarización de técnicas inmunoenzimáticas

Selección del inmunoensayo

Ante todo debemos precisar qué principio usar para evaluar la inmunogenicidad de una vacuna o candidato vacunal que induzca la producción de anticuerpos, o la detección de estos marcadores en estudios seroepidemiológicos.

Podemos seleccionar el clásico ensayo indirecto o los nuevos ensayos de doble antígeno, en este caso, cuando se requiera una elevada sensibilidad y no constituya un inconveniente detectar otras clases de inmunoglobulinas. Cuando se quiere detectar IgG, característico de la respuesta secundaria, es necesario el ensayo indirecto con el uso de conjugados específicos de clase. Los ensayos de inhibición de antígeno, aunque laboriosos, tienen la ventaja de favorecer la interacción antígeno-anticuerpo que se realiza en la fase líquida, correlacionando habitualmente bien con los ensayos in vivo.

Debemos usar ensayos de captura si queremos evaluar la producción de IgM, tal y como describimos en el capítulo anterior. Puede también emplearse el ensayo indirecto, previa depleción de la IgG con antiseros contra la cadena γ (Factor Absorbente). Finalmente el conjugado anti-IgM-enzima detecta esta inmunoglobulina fijada al antígeno de captura.

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

Para detectar subclases de inmunoglobulinas usaremos ensayos indirectos amplificados con doble conjugado: antesubclase-biotinilada y estreptavidina-enzima.

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

Pasos para la optimización de un inmunoensayo:

1. Preparación de estándares y controles.
2. Evaluación del recubrimiento o sensibilización de la fase sólida.
3. Selección de amortiguadores.
4. Selección de los reactivos de detección.
5. Evaluación de las condiciones de reacción.

Preparación de estándares y controles

Este es un paso crucial, debemos garantizar la obtención de estándares y controles homogéneos para la optimización del ensayo y la ulterior evaluación de inmunógenos vacunales, para ello es recomendable prepararlos a partir de mezclas de suero obtenidas de al menos 50 individuos con elevados títulos de anticuerpos una vez culminado el esquema de inmunización de interés. La respuesta basal de anticuerpos en estos voluntarios debe ser negativa o al menos baja.

Debe garantizarse que los estándares y controles tengan un comportamiento paralelo a las muestras y cada vez que sea posible deben ser referenciados contra ensayos in vivo que midan protección. El rango seleccionado de la curva estándar debe tener un adecuado ajuste lineal, presentando coeficientes de determinación (R^2) $\geq 0,98$ e incluir el valor mínimo de protección si es conocido. En el ejemplo, las diluciones seleccionadas corresponden a la línea con marcadores cuadrados (Figura 2,1). Se requiere además alcanzar una buena discriminación entre el mayor punto de la curva y los sueros negativos.

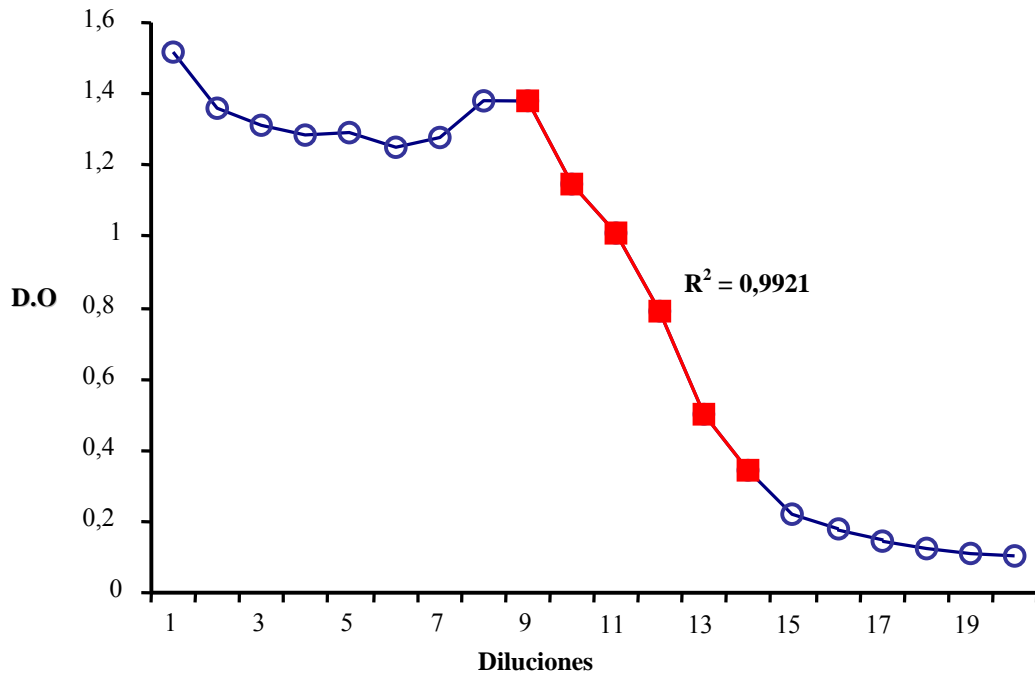


Figura 2,1. Determinación del rango de la curva estándar.

Una mención particular para la estabilización de los sueros de referencia que reviste una especial importancia para la fiabilidad de los resultados. La congelación y descongelación reiteradas provoca la desnaturalización de las proteínas. Se han empleado distintos procedimientos estabilizadores, entre los que se destaca la liofilización con y sin aditivos, o el uso de azúcares, polialcoholes, aminoácidos o proteínas de diferentes especies para la conservación en medio líquido. Sugerimos el empleo de albúmina sérica humana al 6%, que brinda una concentración similar a la del suero y una menor modificación de la matriz al usar

sus propios constituyentes. Deben incluirse, además, agentes antibacterianos como la azida sódica o el timerosal.

El suero control positivo debe ubicarse en la zona central de la curva, usualmente la de mayor pendiente. Algunos autores recomiendan el uso de controles de alta, media y baja concentración, este último en la zona del valor mínimo de protección si es conocido. Los controles negativos son útiles fundamentalmente en el proceso de estandarización. Para estimar el rango de los sueros controles deben realizarse al menos 500 réplicas; una vez estimada la normalidad de la distribución, el rango se define como el valor promedio \pm dos desviaciones estándar (DE), aunque algunos investigadores emplean tres. Hay que tener en cuenta que, atendiendo a la distribución gaussiana, con dos DE se incluye el 95,5% de las réplicas, y con tres, el 99,7%.

En el caso de los ensayos cualitativos debe determinarse el valor de corte, definido de acuerdo con nuestros intereses, teniendo en cuenta la sensibilidad y especificidad. Generalmente los métodos de pesquijaje requieren la máxima sensibilidad y los confirmatorios una elevada especificidad. Para establecer el valor de corte deben usarse paneles de muestras (M) positivas y negativas, y deben siempre referirse a los controles positivos (P) o a los negativos (N). Recomendamos su cálculo basado en el método del valor límite, en el que la lectura de cada muestra se normaliza mediante uno de los siguientes procedimientos: el cociente M/N o M/P, la diferencia M-N o M-P, combinando ambos controles, por ejemplo (M-N)/(P-N), o sustrayendo el valor del blanco reactivo, entre otras variantes; así se pueden comparar los valores obtenidos en diferentes corridas. En el gráfico de distribución de frecuencias que presentamos como ejemplo (Figura 2,2), con el cociente $M/N = 2,5$ se alcanza una sensibilidad y especificidad del 100%, de tal forma, definimos como valor de corte 2,5 veces el promedio de los controles negativos.

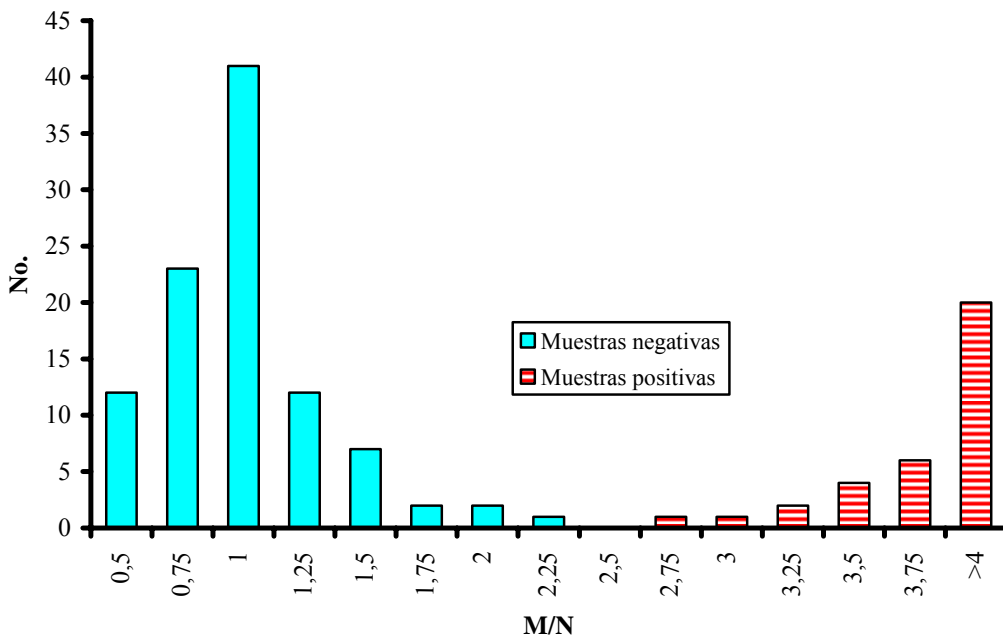


Figura 2,2. Distribución de frecuencias para estimar el valor de corte.

Evaluación del recubrimiento o sensibilización de la fase sólida

A) Selección del soporte sólido

La unión de antígenos o anticuerpos a un soporte sólido puede hacerse de forma covalente o por adsorción no-covalente. La unión covalente elimina de hecho la posible disociación de las moléculas fijadas y facilita su orientación adecuada; es muy útil cuando se usa material biológico de difícil adsorción, como carbohidratos y ácidos nucleicos. Sin embargo, los materiales diseñados para establecer este tipo de enlaces son caros y en la mayoría de los casos puede alcanzarse una adecuada adsorción no-covalente.

En los ELISAs es extremadamente importante el paso de sensibilización de la fase sólida. En estos ensayos hay una proporcionalidad entre el número de moléculas inmovilizadas en la primera capa sobre la matriz sólida y las que reaccionan en la segunda capa, esta proporcionalidad continúa en capas posteriores y es responsable de la sensibilidad del ensayo. Además, es vital que la orientación de las moléculas inmovilizadas sea la correcta, por ejemplo, los anticuerpos deben unirse por el fragmento Fc para permitir una interacción adecuada con el antígeno; son también requisitos necesarios que estas moléculas presenten una disociación mínima, mantengan la actividad biológica y se alcance en el ensayo un bajo valor de fondo.

El número de moléculas adsorbidas en la primera capa es aproximadamente de 100 ng/cm² en plásticos normales; cuando se usan superficies de alta captación puede incrementarse alrededor de 400 ng/cm². La adsorción de las biomoléculas depende, principalmente, de las débiles pero numerosas fuerzas de atracción intermoleculares, basadas en polaridades eléctricas intramoleculares: alternativas y estacionarias, mediadas principalmente en el primer caso por grupos hidrofóbicos y en el segundo, por grupos hidrofílicos.

Se usan un gran número de materiales y formas. Las matrices sólidas particuladas, como perlas o micropartículas, las membranas y los formatos de tubos, tiras o placas tipo “estrella”, generalmente brindan una mayor sensibilidad y detectabilidad al aumentar la superficie de contacto y posibilitan disminuir los tiempos de reacción; sin embargo, la mayor parte de estos formatos son menos apropiados para el procesamiento de un elevado número de muestras. Existen otros formatos adecuados para el diagnóstico individual como las tiras y palillos reactivos. Los tubos y sobre todo las microplacas, con sus múltiples variantes, siguen siendo las de elección en los ELISAs cuando se desea procesar un elevado número de muestras.

Aunque existe un gran número de materiales: cloruro de polivinilo, polipropileno, acrílico, nitrocelulosa, entre otros, el poliestireno es el más usado por su excelente calidad óptica, por facilitar enlaces estables y su dureza mecánica. Para la lectura colorimétrica se usa poliestireno transparente, si es fluorimétrica, blancos o negros.

Las microplacas de poliestireno pueden ser estándares o de alta captación. Estas últimas, además de los grupos hidrofóbicos característicos de este material, tienen una fina red de grupos hidrofílicos capaces de establecer puentes de hidrógeno (Tabla 2,1). La alta energía requerida para la introducción de átomos de oxígeno, nitrógeno u otros grupos polares al poliestireno puede ser producida por irradiación gamma o beta. Esta modificación produce una superficie con excelentes propiedades para la captación de moléculas hidrofílicas.

Tabla 2,1. Poliestireno según su preferencia para la adsorción de biomoléculas.

Alta captación	Estándar
Proteínas y péptidos con predominio de aminoácidos hidrofílicos	Proteínas y péptidos con predominio de aminoácidos hidrofóbicos
Glicoproteínas	Lipoproteínas
Poliglicanos	Lípidos

En los antígenos de pobre adsorción deben emplearse soportes que faciliten la unión covalente; sin embargo, pueden usarse también plásticos convencionales, y la inmovilización se logra a través de moléculas puentes, como son: la albúmina sérica bovina o humana metilada y otras sustancias policatiónicas como la poli-L-lisina. En el caso de los péptidos sintéticos puede también alcanzarse mediante extensión del extremo N-terminal con grupos que faciliten su adsorción.

B) Inmovilización del material biológico

La inmovilización del material biológico que se debe emplear depende principalmente de:

1. Las características del soporte sólido: composición química y forma.
2. Propiedades de la biomolécula: la velocidad de difusión disminuye proporcionalmente al aumento del volumen hidrodinámico; por consiguiente, la velocidad y la adsorción de las grandes moléculas es menor que las pequeñas. Según sea su hidrofobicidad y el tipo de soporte sólido, se favorecerá o no la adsorción, tal y como hemos señalado.
3. Concentración de la biomolécula: a mayor concentración se incrementa la adsorción. Concentraciones entre 1-10 $\mu\text{g/mL}$ son generalmente suficientes, aunque deben estimarse en cada caso. Las elevadas concentraciones pueden provocar una disminución de la sensibilidad y la detectabilidad del ensayo (efecto "gancho") por la formación de sobrecapas de biomoléculas débilmente adsorbidas, que se liberan fácilmente en los pasos subsiguientes inhibiendo los inmunorreactantes en la fase líquida. Aunque pueda parecer obvio, debe garantizarse la máxima purificación del material biológico para una óptima inmovilización.
4. Tiempo y temperatura: son directamente proporcionales a la adsorción, en el segundo caso debido al aumento de la velocidad de difusión que incrementa la interacción entre la biomolécula y la fase sólida. Se requiere también un tiempo apropiado para lograr una inmovilización efectiva; sin embargo, cuando se prolonga demasiado el tiempo o se aumenta excesivamente la temperatura, puede disminuir la adsorción por desnaturalización de las biomoléculas. Hay una relación inversa entre tiempo y temperatura que debe ser controlada estrechamente; por ejemplo, incubaciones de 2-4 horas a 37 °C son equivalentes a 16-20 horas a 2-8 °C. Generalmente esta última combinación es satisfactoria, aunque el tiempo y la temperatura óptimos son particulares para cada biomolécula. La adsorción de células puede requerir su

dsecado durante 16-20 horas entre 33-37 °C, preferentemente con una humedad relativa menor del 50%.

5. Amortiguadores: la adsorción es más fuerte cerca del punto isoelectrico de la biomolécula; sin embargo, el amortiguador de elección se determina experimentalmente. El más común y de mejores resultados sigue siendo el amortiguador carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Entre otros amortiguadores tenemos: tris 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 8,5; tris 0,05 M, pH 8,0; fosfato de sodio 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2; citrato 0,1 M, pH 6,0; el clásico amortiguador fosfato salino 0,15 M, pH 7,2 e, incluso, el agua desionizada puede ser el seleccionado. No deben emplearse amortiguadores con elevada fuerza iónica, detergentes, otras moléculas que puedan competir con los sitios de unión a la fase sólida o aumentar la viscosidad de la solución.
6. Agitación: facilita el encuentro entre la biomolécula y la superficie. Mediante este procedimiento son menos críticos otros factores como la viscosidad de la solución y la temperatura.

C) Procedimiento

Definimos como la concentración óptima de recubrimiento a una temperatura, tiempo y amortiguador definidos, como aquella con la que se alcance la meseta de mayor señal con los sueros estándares o controles positivos y la menor para los sueros negativos y el blanco reactivo; resultado que debe repetirse en una serie de diferentes concentraciones cercanas, entre las cuales no deben encontrarse diferencias según la prueba de análisis de varianza. En la práctica se prefiere recubrir a un ligero exceso de material biológico, siempre y cuando se cumplan las condiciones anteriores. En el gráfico de titulación del recubrimiento que les mostramos, la concentración de elección sería sobre los 4 µg/mL (Figura 2,3).

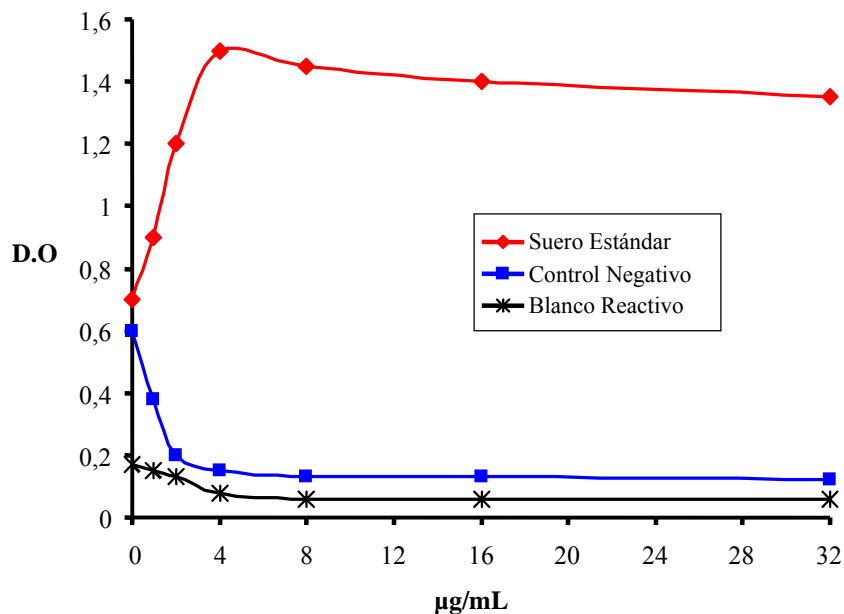


Figura 2,3. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento.

Tradicionalmente se han empleado solo sueros positivos para determinar la concentración óptima de recubrimiento en los ELISAs no competitivos; sin embargo, este procedimiento no tiene en cuenta que puede alcanzarse una elevada señal, sobre todo en biomoléculas de alto peso molecular, sin una real saturación de la fase sólida, debido al impedimento estérico, por una parte en la propia etapa de sensibilización y por otra en el paso de captura de los anticuerpos presentes en las muestras. Los espacios libres pueden ser ocupados por inmunoglobulinas no específicas o el conjugado, lo que aumenta el valor de fondo, incidiendo negativamente en la detectabilidad del ensayo.

El procedimiento descrito permite alcanzar una mayor saturación de la fase sólida, ya que no solo valora la máxima señal alcanzada con los sueros positivos, sino la menor con los negativos y el blanco reactivo, de esta forma verificamos la ocupación de los espacios libres por las propias biomoléculas de cada ensayo, haciendo innecesario en muchas ocasiones un procedimiento de bloqueo.

Cuando el bloqueo sea necesario debe hacerse con una molécula inerte como: seroalbúmina bovina, gelatina, suero fetal de ternera o de otra especie, caseína o leche descremada, aunque estas dos últimas deben evitarse cuando se evalúan sueros para enfermedades autoinmunes, por el riesgo de anticuerpos anticaseína. Las concentraciones, tiempo y temperatura usados son muy variables. El tween 20, además de detergente, es un eficaz agente bloqueador, por lo que habitualmente es suficiente con los lavados usados para eliminar el exceso de reactantes en el recubrimiento.

El recubrimiento en los ELISAs competitivos se realiza a las concentraciones que faciliten la competencia entre el conjugado y el analito no marcado en la muestra.

Selección de amortiguadores

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

Ejemplos de amortiguadores:

- Amortiguador fosfato salino 0,15 M, pH 7,2 – 7,4
- Amortiguador tris 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,8
- Amortiguador tris 0,015 M, NaCl 0,15 M, pH 7,8

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

Selección de los reactivos de detección

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

Evaluación de las condiciones de reacción

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

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

El tiempo de reacción óptimo para muestras y conjugado se determina por la mayor discriminación entre el estándar o el control positivo y el control negativo, según la prueba de análisis de varianza. Debe tenerse en cuenta que un excesivo tiempo de reacción puede incrementar las uniones inespecíficas, sobre todo en los ensayos indirectos, en los que ordinariamente son suficientes condiciones de reacción de una hora a 37 °C en los pasos de muestra y conjugado, así como de 30 minutos para el sustrato a 20-25 °C.

De forma similar se procede para determinar la concentración de trabajo (dilución) del conjugado y las muestras. Puede usarse cualquier líquido corporal, incluyendo la sangre o suero secado sobre papel de filtro, aunque habitualmente el suero es el material de elección.

Las muestras pueden analizarse puras o en bajas diluciones (ensayos tipo sándwich) o altas, sobre todo en los ensayos indirectos, en dependencia de los objetivos del ensayo, las características del material de captura y del conjugado. Cuando se requiere usar diferentes diluciones de una misma muestra, debe demostrarse un adecuado paralelismo y especificidad. Por otra parte, la lectura de las muestras, debe estar dentro del rango de la curva estándar en los inmunoensayos cuantitativos, o ser detectada en los cualitativos.

Conclusión

La estandarización de un inmunoensayo es un proceso dinámico, en el que las fronteras entre este procedimiento y el de validación, que veremos en el siguiente capítulo, no están claramente definidas. Una buena estandarización es necesaria para obtener buenos resultados en el proceso de validación, de este puede derivarse la necesidad incluso de la reestandarización del método.

Bibliografía

1. Esser P. Blocking Agent and Detergent in ELISA. *Nunc Bulletin* 1991;6(9):1-4.
2. Esser P. Principles in Adsorption to Polystyrene. *Nunc Bulletin* 1988;11(6):1-5.
3. Harlow E, Lane D, editors. Immunoassays. En: *Antibodies. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998. p.553-612.
4. Labsystems Research Centre. *Studies on Immobilization of Biological Materials. Enhanced Adsorption to Modified Polystyrene*. Helsinki: Labsystems; 1998.
5. Lovborg U. *Guide to Solid Phase Immunoassays*. Roskilde, Denmark: Nunc; 1984.
6. Ochoa R. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. Capítulo 3. En: *Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas*. Ciudad de la Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.31-45.
7. Ochoa R. *Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos*. (Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias Médicas). Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana; 2002.
8. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R, et al. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor* 2000;9(3):13-8.
9. Ochoa R, Nerey M, Martínez JC. Use of Poly-L-Lysine Precoating in an ELISA for the Detection of Antibodies against Serogroup C *Neisseria Meningitidis* Capsular Polysaccharide. *Biotecnología Aplicada* 1999;16:173-5.
10. Tijssen P. Kinetics and Nature of Antibody-Antigen Interactions. En: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. London: Elsevier; 1993. p.123-49.
11. Tijssen P. The Immobilization of Immunoreactants on Solid Phases. En: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. Amsterdam: Elsevier; 1993: p.297-328.
12. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Nuffield Laboratories of Comparative Medicine. London: Dynatech Europe; 1979.

Capítulo 3

Validación de inmunoensayos cuantitativos y cualitativos

Validación. Generalidades

Los inmunoensayos empleados en los estudios preclínicos y clínicos para la evaluación de la inmunogenicidad de vacunas requieren de una adecuada consistencia en sus resultados, de tal forma que pueda compararse la inmunogenicidad de una vacuna dada en diferentes investigaciones. Esto tiene particular relevancia cuando se analiza la consistencia clínica. También es un requisito indispensable para los estudios inmunoepidemiológicos.

La apropiada estandarización del ensayo analítico, seguido de la validación del método y la homogeneidad de los reactivos químicos y biológicos a lo largo de los diferentes estudios, son elementos imprescindibles para alcanzar óptimos resultados. Para estandarizar un inmunoensayo se requiere determinar las condiciones de trabajo óptimas de los reactivos químicos y biológicos, la temperatura y el tiempo de incubación en cada etapa, la dilución idónea de las muestras y la preparación de estándares y controles, entre otros aspectos que abordamos en el capítulo anterior.

Realmente la separación entre estandarización y validación en cualquier técnica es puramente convencional. Con una adecuada estandarización se alcanzan indicadores óptimos en el ensayo. Por otra parte, los distintos indicadores analizados en el proceso de validación no solo nos permiten calificar la técnica estandarizada, sino que nos orientan sobre dicho proceso. De sus resultados podemos concluir la necesidad de la modificación o reestandarización del método.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos.

En general se consideran tres **tipos de validación**:

1. Validación prospectiva: La que se realiza a técnicas nuevas.
2. Validación retrospectiva: Para técnicas no validadas anteriormente y de las que se tiene documentación suficiente para probar la calidad del método.
3. Revalidación: Cuando hay cambios significativos en las condiciones originales del método o cuando este lleva largo tiempo utilizándose.

Los estudios de validación pueden agruparse según sean los ensayos: cuantitativos o cualitativos. Son definidos como cuantitativos los que usan curvas estándar (de calibración) para calcular la concentración o actividad de las muestras estudiadas. Algunas técnicas que usan una escala discontinua se denominan semicuantitativas; sin embargo, si usan estándares de calibración es mejor evitar ese término intermedio y analizarlas como cuantitativas. Son cualitativos aquellos ensayos que no ofrecen un resultado numérico, sino que es dado en forma binaria; por ejemplo, positivo o negativo.

Validación de inmunoensayos cuantitativos

En las técnicas cuantitativas usadas para evaluar la inmunogenicidad de vacunas, los indicadores fundamentales (Figura 3,1) que se deben evaluar son:

- Precisión
- Exactitud
- Linealidad de la curva estándar
- Rango o intervalo
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Selectividad
- Tolerancia o fortaleza
- Robustez

Debe conocerse que no existe un acuerdo universal acerca de la definición de algunos indicadores y, a su vez, el mismo indicador puede ser determinado por diferentes métodos.

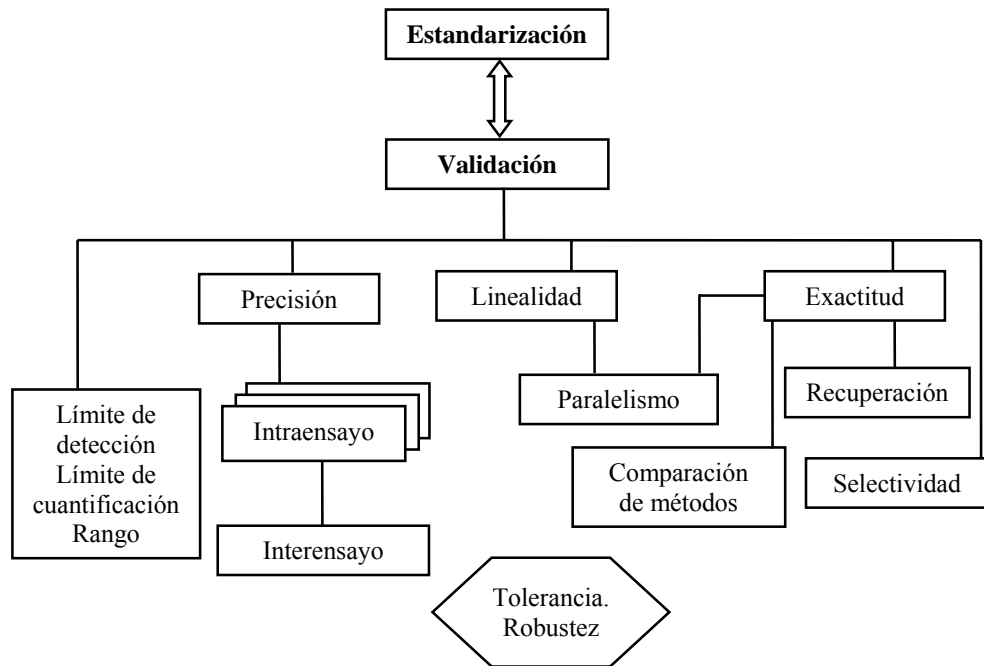


Figura 3,1. Diagrama de flujo para la validación de ensayos cuantitativos.

A) Precisión

La precisión de un método se define como la dispersión de los datos obtenidos para una muestra procesada varias veces. La precisión se expresa como el coeficiente de variación (CV). Este es la desviación estándar dividido por el valor promedio de los replicados de una muestra, expresado habitualmente en porcentaje.

Puede clasificarse en:

1. Precisión intraensayo: Es el que se obtiene cuando se procesan varias réplicas de diferentes muestras en un mismo ensayo; es decir, la precisión entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones (repetibilidad). Deben analizarse muestras que hayan sido procesadas independientemente, desde la preparación hasta los resultados finales y usarse al menos dos diferentes concentraciones del analito, alta y baja, aunque es preferible añadir una muestra de concentración media, o más muestras si se quiere alcanzar una mejor evaluación. Una de estas debe tener una concentración próxima al valor de decisión clínica, otra, un valor cercano al límite superior del intervalo analítico, y la tercera un valor cercano al límite inferior. El número de repeticiones recomendado varía desde 5 a 10. Hemos obtenido óptimos resultados analizando al menos una muestra para cada segmento de la curva de calibración; así, en una curva de seis puntos, usaremos cinco muestras con diez replicados de cada una.
2. Precisión interensayo: Es la que se obtiene entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones. Se evalúan muestras con diferentes concentraciones, tal y como anteriormente describimos. De cada muestra se hacen entre 3 a 10 replicados en un ensayo dado, repitiendo este procedimiento al menos dos veces en días diferentes para un total de tres ensayos.

La precisión interensayo permite también explorar la reproducibilidad del trabajo de un laboratorio durante un período de tiempo determinado, para evaluar la ejecución entre los técnicos, la variación entre laboratorios o lotes de reactivos.

Algunos autores designan como reproducibilidad al estudio interlaboratorio que describe la máxima variabilidad de un procedimiento analítico, y definen como precisión intermedia la que expresa las variaciones dentro del laboratorio. Otros calculan la precisión interensayo a partir de los valores promedios de los ensayos, y la precisión total con todos los valores obtenidos para una muestra, dentro y entre los ensayos.

Los inmunoensayos enzimáticos, por su propio carácter, son menos precisos que las técnicas químicas, físicas o bioquímicas, por lo que el criterio de validación es menos riguroso.

El coeficiente de variación [$CV = (\text{desviación estándar} / \text{promedio}) \times 100$] no debe superar el 10% en la prueba de precisión intraensayo y el 20% en la interensayo; se consideran óptimos los inferiores al 5% y al 10% respectivamente. Sin embargo, algunas normas admiten hasta el 20% en la prueba intraensayo. No deben encontrarse diferencias significativas mediante el análisis de varianza.

B) Exactitud

Es el grado de identidad de los valores analíticos obtenidos con cierto método y el contenido real del analito en la muestra. Indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible al verdadero valor. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Con la evaluación de este indicador se investigan los componentes que influyen en la veracidad del método (error sistemático), además de predecir la magnitud y la dirección del error.

Para evaluar la exactitud se recomienda efectuar los estudios siguientes:

1. Ensayo de recuperación: Evalúa la capacidad del método de recobrar una concentración exógena de analito, añadida a una muestra con concentración endógena libre de este o con baja concentración. Se expresa y calcula matemáticamente en forma de porcentajes de recuperación. Para su estudio se puede emplear una muestra de concentración conocida que se analiza de 6 a 10 veces, aunque es más recomendable usar al menos tres cantidades diferentes de analito, de forma tal que se abarque el rango analítico. Al igual que en la precisión, sugerimos explorar cada uno de los segmentos de la curva de calibración.
2. Ensayo de paralelismo o de dilución: Este ensayo es usado también para evaluar la linealidad. Para que los resultados de este método sean válidos es esencial que el analito en el estándar y las muestras tengan un comportamiento similar; por esta razón las diluciones no deben afectar el resultado final. Con este ensayo se evalúa el efecto matriz. Se preparan al menos tres diluciones de no menos cinco muestras, cubriendo el rango analítico, y se evalúan como mínimo en triplicado.
3. Ensayo de comparación de métodos: La comparación con otro método de referencia tiene como objetivo determinar la equivalencia de métodos analíticos diferentes y permite explorar, además de la exactitud, la precisión. Debe tenerse en cuenta que si se aprecian diferencias, estas pueden ser causadas por las propias limitaciones del método, por lo que estos estudios nunca deben emplearse de forma aislada para evaluar el error sistemático. Este estudio se puede llevar a cabo a concentración única del analito o preferentemente con varias concentraciones diferentes que abarquen el rango analítico. El tamaño de la muestra debe ser adecuado para permitir el estudio estadístico, y diferirá en función del modelo estadístico empleado para el tratamiento de datos. Algunos autores recomiendan estudiar al menos 25 muestras y, de ser posible, procesarse en diferentes series. Debe tenerse en cuenta la imprecisión de ambos métodos y seleccionar cuidadosamente el de referencia, que debe ser la “regla de oro”, o al menos un método de igual o superior generación; o tener características que lo hagan especialmente necesario o insustituible, como puede ser la evaluación funcional de los efectores de la respuesta inmune inducida por los inmunógenos vacunales, que correlaciona generalmente con la protección.

En los estudios de exactitud pueden usarse varios métodos de cálculo, para lo cual a los datos se les hacen los tratamientos siguientes:

1. Porcentaje de recuperación.

2. Demostración de que no existen diferencias significativas entre el valor hallado y el valor considerado verdadero.
3. Por análisis de regresión.

El porcentaje de recuperación es un procedimiento sencillo y eficaz para evaluar la exactitud. La recuperación se define como el error entre el valor observado u obtenido y el real o esperado (valor obtenido en el ensayo $\times 100$ / valor esperado) y debe encontrarse entre el 90% y 110%. Tomemos como ejemplo (Tabla 3,1) dos muestras positivas del analito evaluado, las que se diluyen (volumen/volumen) con una muestra libre del mismo. Se observa que con la primera se obtienen resultados inexactos.

Tabla 3,1. Exactitud medida por un ensayo de recuperación.

Muestras sin diluir	Valor esperado	Valor obtenido	Recuperación (%)
160	80	60	75
80	40	42	105

Muestras sin diluir = La concentración calculada en la muestra.

Valor esperado = Es la concentración teórica o real. En este caso: muestras sin diluir / 2.

Valor obtenido = Es la concentración calculada en el ensayo.

Recuperación = (Valor obtenido $\times 100$) / Valor esperado.

Cuando se usa una muestra de concentración única, los resultados pueden expresarse en porcentaje y se pueden comparar las series mediante la prueba de Fisher, seguido de la prueba t de Student para determinar si hay o no diferencias entre el valor medio hallado y el considerado verdadero.

En el caso que se analicen varias muestras de concentraciones diferentes, se utiliza la prueba C de Cochran u otra similar para verificar la homogeneidad de las varianzas, y se calcula la recuperación. Para determinar si la exactitud es aceptable puede emplearse una prueba t de Student para muestras pareadas.

La exactitud puede estudiarse calculando la recta de regresión entre los valores teóricos y los obtenidos en el ensayo, previa verificación de la homogeneidad de las varianzas para cada punto de la curva con la prueba C de Cochran y evaluación del modelo lineal con la prueba de análisis de varianza. El coeficiente de determinación (R^2) debe ser $\geq 0,98$ y el de correlación (r) $\geq 0,99$ (Figura 3,2). Para confirmar si la recuperación es satisfactoria o no, se aplica la prueba t de Student. En el ensayo de comparación de métodos, a medida que los coeficientes y la pendiente se acerquen a 1 y el intercepto tienda a 0 serán más semejantes el método evaluado y el de referencia.

El CV es también empleado en los ensayos de dilución. Se basa en que al diluir una muestra de concentración conocida y luego de corregida por el factor de dilución, los resultados deben ser idénticos dentro del error experimental, por lo que el CV no debe superar el 10%.

Una buena precisión no implica una buena exactitud y viceversa, por lo que ambos indicadores deben ser explorados profundamente.

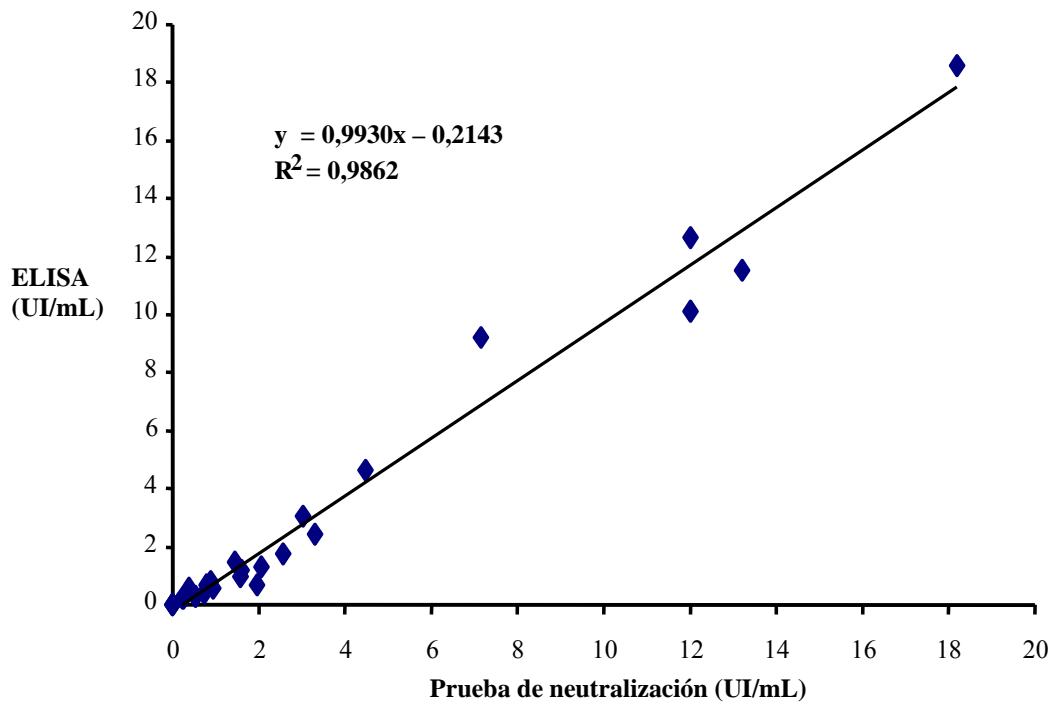


Figura 3.2. Análisis de regresión lineal entre los valores de actividad de anticuerpos obtenidos por ELISA y una prueba de neutralización in vivo empleada como referencia.

C) Linealidad

Se entiende por linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado.

Se prefiere hablar de comportamiento lineal, pues está claro que en ensayos biológicos, a diferencia de muchos químicos, no existe per se, por lo que se emplean diversos métodos para linealizarla, como describiremos en capítulos posteriores. El empleo de curvas con varios puntos no sería necesario si el ajuste fuera lineal, en el que dos puntos son suficientes. En la mayor parte de los ensayos biológicos se necesita un análisis de regresión polinomial que valore más eficazmente el ajuste de la curva.

Dentro del término linealidad se incluye la proporcionalidad entre la concentración de analito y respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de analito para los cuales el método es satisfactorio. También se relaciona con la sensibilidad de calibrado o cociente diferencial entre la señal medida y la concentración de analito, y es igual al valor de la pendiente de la curva de calibración a una concentración determinada.

Se puede evaluar con los estudios siguientes:

1. Ensayo de paralelismo: Descrito anteriormente. Además, en este caso pueden emplearse muestras con concentraciones de analito sobre el rango analítico y las

diluciones necesarias para evaluar la curva estándar. Se calcula el porcentaje de recuperación y el CV con las concentraciones corregidas por el factor de dilución, así como la recta de regresión, R^2 y r con los valores sin ajustar (Figura 3,3).

- Mezcla de pares de muestras con altas y bajas concentraciones: Pueden usarse al menos cinco pares. Después de analizar cada muestra de forma individual y la mezcla respectiva, como mínimo en triplicado, se determina la recuperación entre el valor calculado en el ensayo y el esperado.

El análisis de los resultados se realiza de forma similar a la descrita en los estudios de exactitud:

- El porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 90% y 110%.
- El R^2 debe ser $\geq 0,98$; $r \geq 0,99$, y el intercepto con el eje de ordenadas no debe diferir estadísticamente de cero en ajustes lineales.
- El CV de los factores de respuesta no debe ser superior al 10% en los inmunoensayos, aunque para otros tipos de ensayos de comportamiento lineal no debe exceder del 5%.

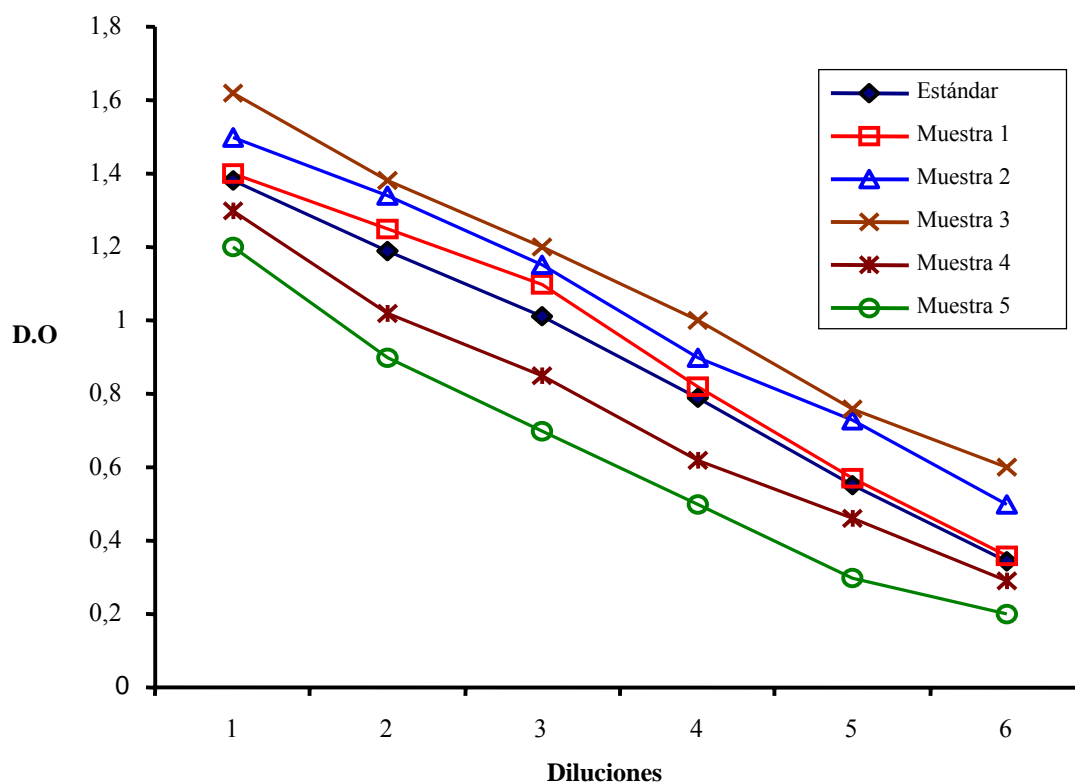


Figura 3,3. Ensayo de paralelismo. El R^2 en todas las curvas es superior a 0,99. El $CV < 10\%$ una vez corregidos los valores por el factor de dilución.

D) Rango

Es el intervalo entre el mayor y el menor nivel de analito que pueden ser medidos con aceptable precisión y exactitud. Puede medirse utilizando un diseño similar al empleado en los estudios de exactitud y linealidad, lo que nos permite efectuar el estudio del rango de forma simultánea.

Una vez realizado todo este conjunto de ensayos, deberán cumplirse los criterios de exactitud y precisión en cada uno de los segmentos del intervalo, así como la linealidad a lo largo del mismo.

E) Límite de detección o detectabilidad

Este término constituye motivo de discusión, ¿es o no sinónimo de sensibilidad? Para diferenciar el término sensibilidad utilizado en los ensayos cualitativos (proporción de muestras positivas o reactivas correctamente identificadas), se ha empleado el término sensibilidad diagnóstica para esta última, en oposición a la sensibilidad analítica. Esta se ha definido como la cantidad mínima detectable diferenciable de cero.

Como límite de detección se conoce a la menor cantidad de analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas. Es decir, la concentración mínima de una sustancia que genera una respuesta consistentemente mayor que el fondo del ensayo.

Para obtener el límite de detección se analiza un blanco adecuado o una muestra libre del analito estudiado. Aunque se ha sugerido usar un número pequeño, entre 6 y 10 de réplicas, es preferible usar un número mayor, al menos 20. Después de verificar la normalidad de la distribución, se calcula el límite de detección, adicionándole al valor medio de la señal obtenida, 2 o 3 desviaciones estándar en los ensayos con curvas de calibración con pendiente positiva, como es el caso de los ELISAs indirectos, o sustrayéndole los valores correspondientes si la pendiente es negativa. La concentración se obtiene interpolando este valor en una curva de calibración apropiada, que incluya concentraciones bajas de anticuerpos contra el analito estudiado.

Una metodología sencilla para curvas lineales consiste en multiplicar 2 o 3 desviaciones estándar del blanco a la concentración de una muestra estándar y dividirlo entre la densidad óptica de la muestra.

El procedimiento de cálculo más actual se basa en la evaluación de al menos 60 mediciones de varias muestras de bajos títulos. La estimación del límite de detección estaría dada por la siguiente fórmula: $LD = 95 \text{ percentil de las mediciones} + 1,65 \text{ (desviación estándar)}$.

F) Límite de cuantificación

Es la mínima concentración del analito que puede determinarse con una precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible), mientras que el de detección es cualitativo (menor cantidad detectable).

G) Selectividad

Se define como la capacidad del método para determinar el analito para el cual está diseñado, exactamente y sin que interfieran otros componentes de la muestra. Es una característica intrínseca del método, que depende del principio de la reacción y del material que se investiga. Los términos selectividad y especificidad se consideran equivalentes, aunque se ha definido la selectividad como la capacidad de detectar separadamente sustancias diferentes que están presentes en una misma muestra, y especificidad la de detectar el analito sin interferencia de ningún otro compuesto.

Se evalúa ensayando muestras que contengan componentes estructuralmente cercanos al analito, u otros que pudieran interferir en los resultados, tales como: hemoglobina, lípidos, anticoagulantes, inmunoglobulinas dirigidas contra otros antígenos y anticuerpos que reaccionen con los reactantes.

Los inmunoensayos usados para detectar inmunoglobulinas específicas en ensayos clínicos de vacunas, deben ser capaces de discriminar entre las muestras tomadas antes y después de completado el esquema de inmunización, y entre los grupos en los que se ha aplicado la vacuna evaluada y su control.

H) Tolerancia o fortaleza

Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones de operación. Para su determinación se realizan los análisis de muestras homogéneas en diversos laboratorios, por distintos analistas y en diferentes días, entre otras condiciones.

I) Robustez

Investiga la influencia de pequeños cambios en las condiciones analíticas sobre la fiabilidad del método analítico, localizando los factores que originan fluctuaciones y los que necesitan una atención especial, en tanto originan variaciones significativas. Para su estudio, se introducen modificaciones en las condiciones experimentales y se observa su influencia. El estudio de robustez cobra mayor importancia en los ensayos cuyas condiciones no requieren un perfecto control.

Conclusión

Los inmunoensayos cuantitativos deben ser optimizados hasta que los indicadores estudiados reúnan las características exigidas para una investigación dada.

Hay que tener en cuenta que los ensayos clínicos de vacunas requieren de herramientas analíticas de elevada precisión y exactitud, que sean capaces de cuantificar un amplio rango de anticuerpos, atendiendo a la individualidad de la respuesta inmune, así como detectar los niveles de anticuerpos protectores, requisitos también necesarios en estudios inmunoepidemiológicos.

Validación de inmunoensayos cualitativos

Los inmunoensayos cualitativos son empleados habitualmente en la evaluación de la inmunogenicidad de vacunas. Sin embargo, la evaluación de estos ensayos presenta varios problemas, ya que no todos los investigadores conocen con precisión qué rasgos los distinguen de un ensayo cuantitativo, ni cuáles indicadores deben emplearse.

En una prueba cuantitativa los resultados se dan en una distribución continua, mientras que en las cualitativas vienen dados en forma binaria: 0/1, no/sí, negativo/positivo, no-seroconvierten/sí-seroconvierten, etc.

La mayor parte de los ensayos semicuantitativos, como el ensayo bactericida en suero, son analizados como cualitativos y la interpretación de muchos ensayos cuantitativos usados para evaluar la inmunogenicidad, se hace en términos cualitativos al determinar la seroconversión inducida por una vacuna.

Debemos precisar que un ELISA puede ser cuantitativo o cualitativo. Un ensayo cualitativo no brinda una información numérica de los resultados, pero esto no significa que sea inferior a una prueba cuantitativa. Las aplicaciones de estos dos ensayos pueden ser diferentes y en algunas situaciones un resultado cualitativo es suficiente.

Debe tenerse en cuenta que en muchos casos no existen materiales de referencia y en otros la naturaleza de los mecanismos de protección no es bien conocida, lo que limita la cuantificación de los resultados o al menos su interpretación.

Indicadores (Figura 3,4) que se deben evaluar:

- Sensibilidad
- Especificidad
- Valor predictivo positivo
- Valor predictivo negativo
- Eficacia o coincidencia
- Estudios de concordancia
- Ancho de la zona “gris” como medida de precisión
- Tolerancia o fortaleza
- Robustez

A) Sensibilidad

Es definida como la proporción de muestras positivas o reactivas correctamente identificadas por la prueba empleada.

B) Especificidad

Proporción de muestras negativas (no reactivas) correctamente identificadas.

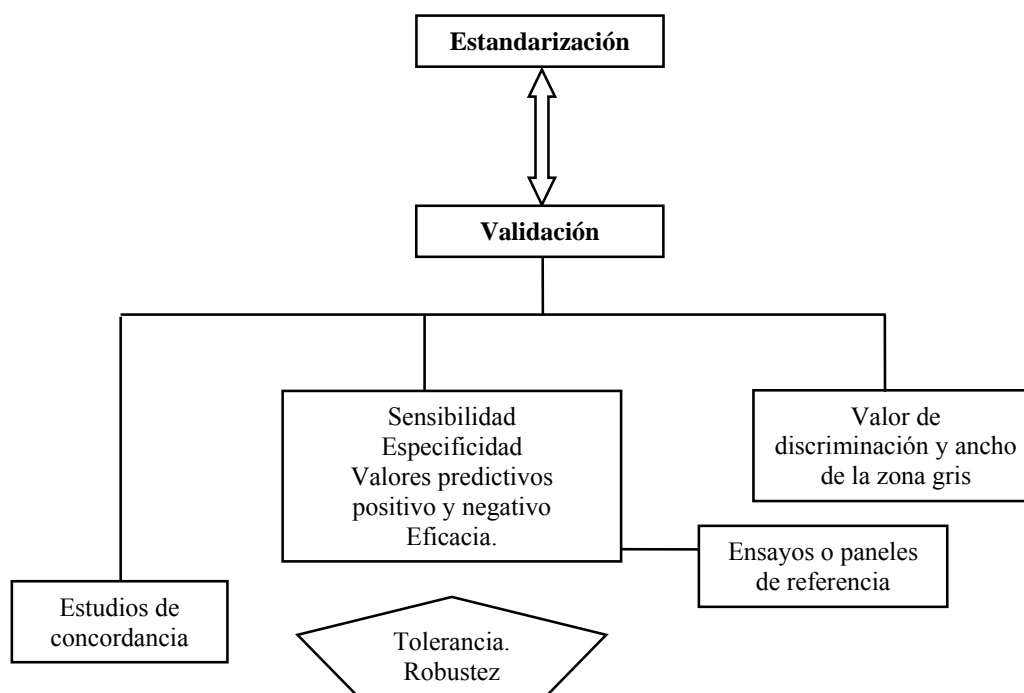


Figura 3,4. Diagrama de flujo para la validación de ensayos cualitativos.

Después de evaluar paneles de muestras adecuadamente clasificadas o comparar nuestro ensayo con uno de referencia, se calcula la sensibilidad (positivos correctamente detectados x 100 / positivos correctamente detectados + falsos negativos) y la especificidad (negativos correctamente detectados x 100 / negativos correctamente detectados + falsos positivos).

Deben estudiarse al menos 100 muestras representativas de la población sobre la que la técnica será usada, en las que se deben encontrar muestras con diverso grado de positividad y muestras negativas obtenidas de individuos con enfermedades relacionadas, inmunizados con otro preparado vacunal y entidades que pudieran condicionar falsos resultados, como enfermedades autoinmunes; así como otros componentes descritos en el acápite “selectividad” de la validación de inmunoensayos cuantitativos.

Los valores óptimos de sensibilidad y especificidad dependen de los propósitos de la técnica, idealmente 100% para ambos, aunque por lo general una elevada sensibilidad se alcanza a expensas de la especificidad y viceversa, estableciéndose habitualmente un compromiso sobre los valores deseados.

La sensibilidad y la especificidad son los indicadores claves para calificar un inmunoensayo.

C) Valor predictivo positivo

Es la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente positivo, cuando el resultado de la prueba que se le practica resulta reactivo (positivos correctamente clasificados x 100 / positivos correctamente clasificados + falsos positivos).

D) Valor predictivo negativo

Es la probabilidad que tiene un individuo de ser negativo, cuando el resultado de la prueba es no reactivo (negativos correctamente clasificados x 100 / negativos correctamente clasificados + falsos negativos).

Los valores predictivos, manteniendo la sensibilidad y especificidad invariables, se modifican drásticamente de acuerdo con la prevalencia de la enfermedad, marcadores inmunológicos, genéticos, bioquímicos o de otra índole, estudiados en la población. A medida que la prevalencia disminuye, el valor predictivo negativo aumenta y el valor predictivo positivo disminuye. Esta probabilidad se calcula según el teorema de Bayes:

$$\text{VPP} = [S \times P] / [S \times P + (1 - E) \times (1 - P)]$$

$$\text{VPN} = [E (1 - P)] / [E (1 - P) + (1 - S) \times P]$$

Donde:

VPP = Valor predictivo positivo

VPN = Valor predictivo negativo

S = Sensibilidad

E = Especificidad

P = Prevalencia

E) Eficacia o coincidencia

Es la capacidad general de un ensayo para detectar correctamente todos los positivos y los negativos (positivos correctamente clasificados + negativos correctamente clasificados / positivos correctamente clasificados + falsos positivos + negativos correctamente clasificados + falsos negativos).

Es decir, una eficacia óptima se alcanzará en aquella técnica que no tenga falsos resultados positivos ni falsos negativos.

Para el cálculo de estos indicadores resulta muy útil el uso de tablas de contingencia (Tabla 3,2), en las que se analizan los resultados alcanzados por la prueba evaluada con respecto a un ensayo o paneles de referencia.

De esta forma aquellos que concuerdan con la referencia se clasifican en verdaderos positivos y verdaderos negativos; como falsos positivos o falsos negativos los resultados discordantes.

Tabla 3,2 Tabla de contingencia para el cálculo de indicadores en ensayos cualitativos.

Ensayo evaluado	Referencia		Total
	Resultados positivos	Resultados negativos	
Resultados positivos	VP (a)	FP (b)	a + b
Resultados negativos	FN (c)	VN (d)	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

VP = Verdaderos positivos o positivos correctamente detectados.

FP = Falsos positivos.

VN = Verdaderos negativos o negativos correctamente detectados.

FN = Falsos negativos

Procedimiento de cálculo:

$$\text{Sensibilidad} = [a / (a + c)] \times 100$$

$$\text{Especificidad} = [d / (b + d)] \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = [a / (a + b)] \times 100$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = [d / (c + d)] \times 100$$

$$\text{Eficacia} = [(a + d) / (a + b + c + d)] \times 100$$

F) Estudios de concordancia

Cuando se requiere la evaluación de diferentes métodos frente a un mismo panel de sueros de referencia, se usan estudios de concordancia (o eficiencia), como son la prueba de McNemar y el más usado índice Kappa. Para calcularlo se emplea la misma tabla de contingencia (Tabla 3,2).

Procedimiento de cálculo:

$$K = (p_o - p_e) / (1 - p_e)$$

Donde:

$$n = a + b + c + d$$

$$p_o = (a + d) / n$$

$$p_e = (P + N) / n$$

$$\text{Concordancia en el caso de positivos } P = \left\{ \frac{(a + b)}{n} \right\} \times \left\{ \frac{(a + c)}{n} \right\} \times n$$

$$\text{Concordancia en el caso de negativos } N = (c + d) - \{(a + c) - P\}$$

El Índice Kappa puede clasificarse en cinco grupos según los resultados alcanzados con respecto a la referencia (Tabla 3,3).

Tabla 3,3. Clasificación del índice de concordancia (K).

Concordancia	Kappa
Deficiente	<0,20
Regular	0,21 – 0,40
Moderada	0,41 – 0,60
Buena	0,61 – 0,80
Muy buena	0,81 – 1,00

En la práctica, cualquier valor de Kappa $<0,5$ denota una baja correlación. Un problema del uso de este índice es que los valores dependen de la proporción (prevalencia) de las muestras de cada categoría, haciendo que no sea posible la comparación entre los diferentes índices procedentes de varios estudios.

La prueba de McNemar es empleada cuando se comparan dos métodos con las mismas muestras y las sensibilidades y especificidades pueden aparearse.

G) Ancho de la zona “gris” como medida de precisión

Algunos investigadores tienen la tendencia a estimar la precisión utilizando la metodología descrita en la validación de inmunoensayos cuantitativos, empleando la absorbancia, la fluorescencia u otra medición de la muestra, sin tener en cuenta que para las técnicas cualitativas lo realmente importante es la clasificación correcta de los resultados.

La zona “gris” es aquella en la que los resultados obtenidos por un inmunoensayo no pueden clasificarse con certeza como positivos o negativos, o son claros pero no reproducibles.

La extensión de esta zona es importante y define la precisión de un ensayo cualitativo, que será mayor a medida que sea más estrecha, tal y como ocurre en el ensayo A de la Figura 3,5. Se evalúa preparando varias diluciones de una o más muestras de referencia, analizando al menos 20 replicados de cada dilución en orden aleatorio y registrando los resultados en positivos o negativos, según el valor de corte definido para el ensayo. La zona gris se extenderá entre el 5% y el 95% de resultados positivos y el valor de discriminación corresponderá a la dilución en la que se obtenga el 50% de resultados positivos.

El valor de discriminación no debe confundirse ni con el límite de detección de los ensayos cuantitativos, ni con el valor de corte (“cut-off”). Este último es un valor que se obtiene utilizando diferentes criterios según los intereses del investigador; la mayor parte de las veces analizando la sensibilidad y especificidad del ensayo, como vimos en el capítulo anterior.

Para calcular el valor de corte con respecto a los ensayos de referencia, puede usarse un modelo que tenga en cuenta el valor predictivo deseado; variando el nivel de decisión se

logra cambiar la sensibilidad, la especificidad y se selecciona el nivel óptimo sobre la base de alcanzar la mayor eficiencia posible.

Este procedimiento de cálculo es muy útil en aplicaciones específicas cuando es necesario usar los valores predictivos para el análisis de los resultados, teniendo en cuenta que con un corte correspondiente a un valor predictivo positivo del 100% podemos afirmar que las muestras positivas por ELISA presentan anticuerpos protectores, si existe concordancia con ensayos funcionales que correlacionen con protección. En el caso del corte correspondiente al valor predictivo negativo del 100%, confirmamos que las muestras negativas realmente lo son. El correspondiente a la mayor coincidencia presentará valores predictivos intermedios.

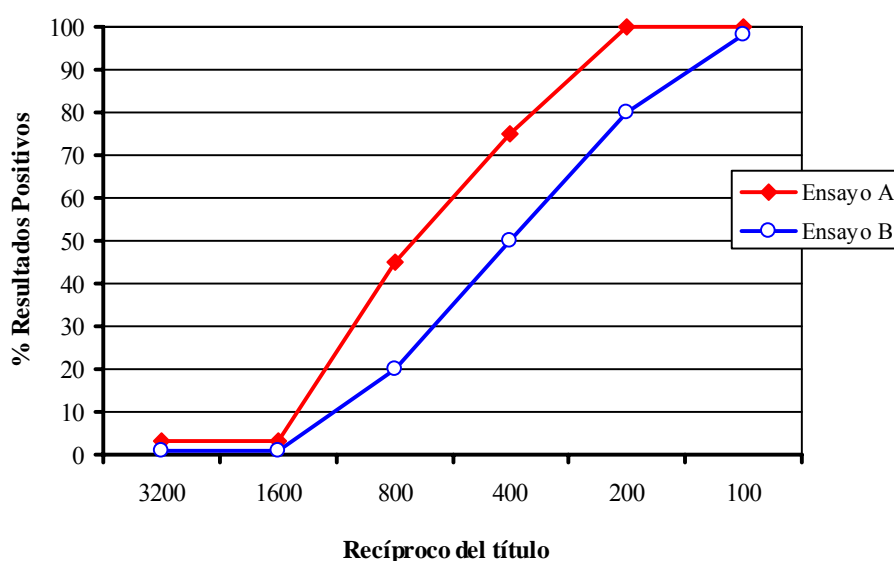


Figura 3,5. Ancho de la zona gris (entre el 5% y el 95%) y el valor de discriminación (50%).

Conclusión

Debemos recalcar, la importancia que para el análisis de la inmunogenicidad de vacunas en ensayos clínicos, tiene el contar con herramientas de evaluación apropiadas, que permitan conocer la magnitud de la respuesta inmune generada.

Estos recursos son igualmente necesarios para garantizar la reproducibilidad de los resultados en los estudios inmunoepidemiológicos, en especial los diseñados para evaluar el comportamiento longitudinal de la inmunidad a partir del estímulo inmunogénico. También es muy importante en los estudios preclínicos, así como en la determinación de la consistencia de los lotes de producción, aplicados a una población determinada.

Los inmunoensayos cuantitativos son fundamentales para estos estudios; sin embargo, los cualitativos, a pesar de que no brindan una información numérica de los resultados, son útiles sobre todo en aquellos casos en que no se cuenta con materiales de referencia, o cuando no son bien conocidos los niveles protectores de los efectores involucrados en los posibles mecanismos de protección.

Bibliografía

1. Broughton PMG, Bergonzi C, Lindstedt G, Loeber JG, Malan PG. *Guidelines for the Evaluation of Diagnostic Kits. Part 2. General Principles and Outline Procedures for the Evaluation of Kits for Qualitative Tests*. Vol. 3, No. 3. London: European Committee for Clinical Laboratory Standards; 1987.
2. Broughton PMG, Bergonzi C, Lindstedt G, Loeber IG, Malan PG, Mathieu M, Pozet S. *Guidelines for a User Laboratory to Evaluate and Select a Kit for its Own Use. Part 1. Quantitative Tests*. Vol. 3, No. 3. London: European Committee for Clinical Laboratory Standards; 1986.
3. Cura E, Wendel S. *Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los Bancos de Sangre*. Washington D.C: Organización Panamericana de la Salud; 1994.
4. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. *A WHO Guide to Good Manufacturing Practice (GMP) Requirements. Part 2: Validation. Validation of Analytical Assays*. Geneva: WHO; 1997. p.65-95.
5. Garret PE, Lasky FD, Meier KL. *User protocol for evaluation of qualitative test performance; approved guideline*. 2nd ed. Vol. 28 No. 3. Wayne, Pennsylvania: NCCLS; 2008.
6. International Organization for Standardization. *ISO 5725-1:1994. International Standard. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 1: General Principles and Definitions*. Geneva: The Organization; 1994.
7. International Organization for Standardization. *ISO 5725-2:1994. International Standard. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 2: Basic Method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method*. Geneva: The Organization; 1994.
8. International Organization for Standardization. *ISO 5725-3:1994. International Standard. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 3: Intermediate Measures of the Precision of a Standard Measurement Method*. Geneva, The Organization, 1994.
9. International Organization for Standardization. *ISO 5725-4:1994. International Standard. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 1: Basic Methods for the Determination of the Trueness of a Standard Measurement Method*. Geneva: The Organization; 1994.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Tentative Guideline. NCCLS Document EP9*, Villanova, PA, The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods; Proposed Guideline. NCCLS Document EP6-P6*, Villanova, PA, The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1986.
12. Ochoa R. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. Capítulo 3. En: *Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas*. Ciudad de la Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.31-45.
13. Ochoa R. *Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos*. (Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias Médicas). Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana; 2002.
14. Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X, Blanco R, et al. Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor* 2000; 9(1):17-20.

15. 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.
16. Serret A, Rosales I. *Validación de métodos analíticos. Segundo Taller Nacional de Validación*, Ciudad de La Habana: Grupo Nacional de Validación; 1997.
17. Tholen D, Linnert K, Kondratovich M, Armbruster DA, Garret PA, Jones RL et al. *Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline*. Vol. 24 No. 34. Wayne, Pennsylvania: NCCLS; 2004.
18. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Nuffield Laboratories of Comparative Medicine. London: Dynatech Europe; 1979.

Sección II

Ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos

Capítulo 4

Generalidades sobre vacunas

Vacunas. Definición

Vacuna es el preparado biológico que se inyecta en un organismo con el fin de lograr un estado de inmunidad contra un determinado agente infeccioso o una enfermedad dada. Esta definición engloba tanto las vacunas preventivas actuales, como las terapéuticas que se desarrollan contra enfermedades autoinmunes, neoplasias, alergias y adicciones, entre otras entidades crónicas. Sin embargo, las diseñadas para prevenir las enfermedades infecciosas siguen siendo de gran interés, teniendo en cuenta la disminución de la morbilidad y de la mortalidad que se previenen con su empleo.

La vacunación constituye uno de los mayores logros alcanzados por la salud pública a escala mundial. Con la excepción del suministro estable de agua potable, ninguna otra intervención de salud ha tenido el impacto de la vacunación para reducir la prevalencia de las enfermedades infecciosas. Cada año las vacunas previenen alrededor de 3 millones de muertes y se evitan incapacidades en cerca de 1 millón de niños.

Tiene un impacto directo sobre la economía (Figura 4,1), es la acción de salud con un mejor balance costo–beneficio al disminuir los costos en tratamientos y hospitalizaciones, reducir las incapacidades y la improductividad. Los beneficios que se obtienen son a largo plazo y contribuyen activamente no solo con el desarrollo económico, sino el social.

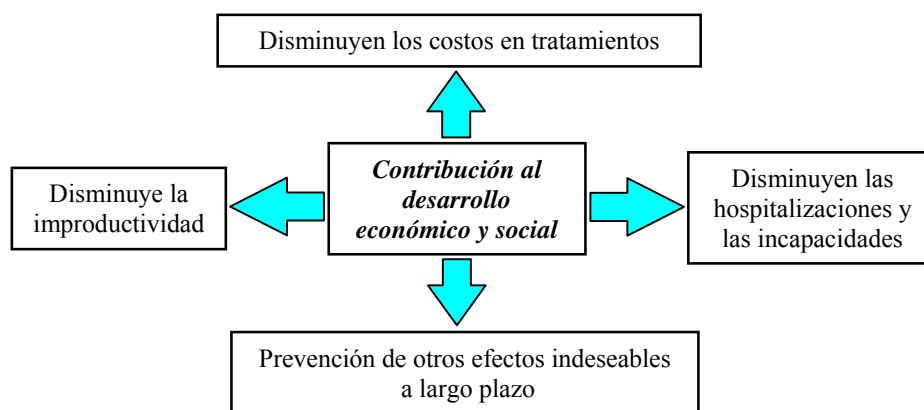


Figura 4,1. Impacto de la vacunación sobre la economía.

De este procedimiento se obtiene un resultado colectivo, la inmunidad poblacional, antes llamada de “rebaño”, esencial en la profilaxis de las enfermedades transmisibles, incluso en aquellos individuos que hayan quedado sin proteger por no haber sido inmunizados o por ser no-respondedores o hiporrespondedores ante el estímulo inmunogénico; en ellos la prevención se alcanza al interrumpir la cadena de transmisión.

Clasificación de las vacunas

Se clasifican según los siguientes criterios:

- Su composición.
- Tipo de respuesta inmune inducida.
- Sus objetivos.
- La tecnología de producción empleada.
- La capacidad de autorreplicarse.

Según su composición las vacunas pueden ser de microorganismos enteros o de sus fracciones, independientemente de la tecnología de producción empleada.

Las vacunas pueden inducir preferentemente una respuesta inmune a predominio de la vertiente humoral o celular, o con participación de ambos componentes, lo que está íntimamente relacionado con las características del agente infeccioso o el inmunógeno vacunal. Los compuestos por microorganismos inactivados o sus fracciones, estimulan la vertiente humoral, mediada por anticuerpos, aunque generalmente requieren de la participación de linfocitos T cooperadores para la producción apropiada de anticuerpos (Figura 4,2).

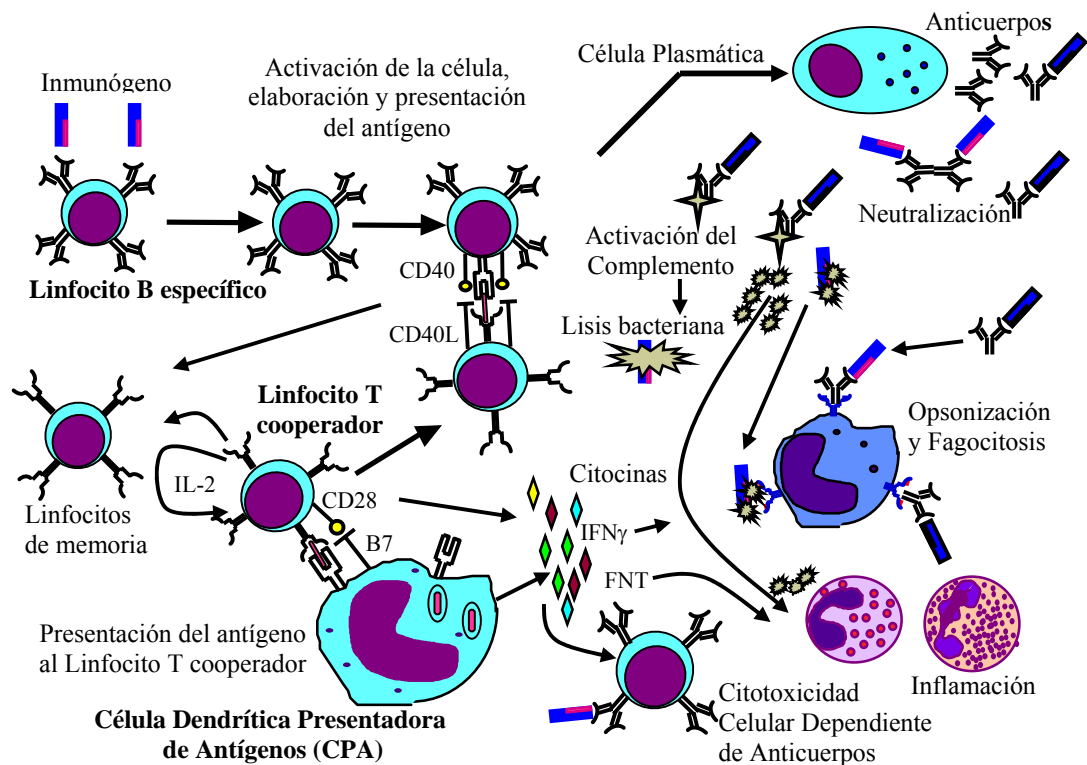


Figura 4,2. Respuesta inmune humoral timodependiente.

Las vacunas de gérmenes vivos inducen una adecuada inmunidad celular, es decir, mediada por linfocitos cooperadores CD4+ de la subpoblación Th1, cuya célula efectora final es el macrófago activado, así como por linfocitos citotóxicos (Tc) CD8+ (Figura 4,3).

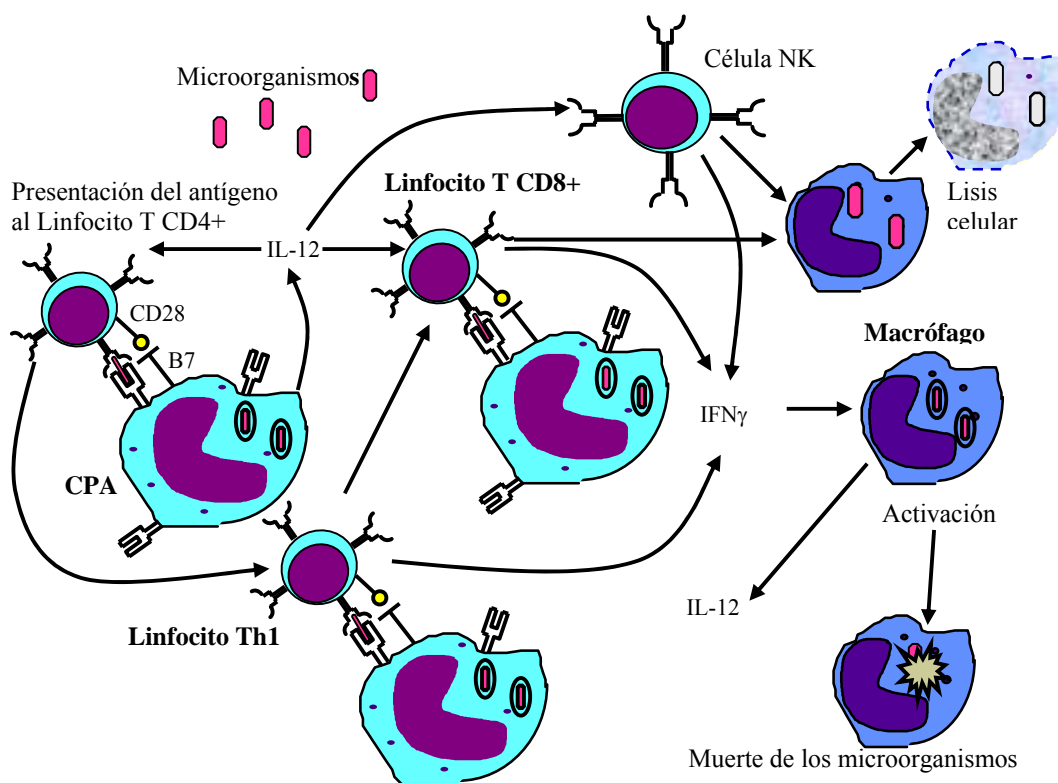


Figura 4,3. Inmunidad contra microorganismos intracelulares.

La tecnología de producción permite dividir las vacunas en clásicas o modernas, entre las primeras incluimos bacterias o virus vivos atenuados, o inactivados, así como sus fracciones naturales.

Las tecnologías modernas abarcan la conjugación de polisacáridos bacterianos con proteínas portadoras para una respuesta timodependiente, así como la obtención de inmunógenos por recombinación genética y síntesis química, entre otros.

Las vacunas según su capacidad de autorreplicarse pueden dividirse en replicativas o no. Este es a nuestro juicio el criterio de clasificación más integral, ya que incluye los anteriores y es además muy útil para evaluar el tipo de respuesta inmune estimulada, teniendo en cuenta que los inmunógenos replicativos se caracterizan por respuestas mediadas por linfocitos Tc, Th y anticuerpos.

Los microorganismos vivos atenuados son ejemplos clásicos de vacunas replicativas (Tabla 4,1). Entre las no replicativas tenemos las vacunas compuestas de microorganismos enteros inactivados y las vacunas de subunidades. Estas últimas pueden ser obtenidas de exotoxinas (toxoides), proteínas, péptidos, glicoproteínas de superficie, polisacáridos

capsulares o somáticos externos, vesículas completas de membrana externa, así como otras fracciones. Pueden también ser producidas mediante tecnologías modernas de producción.

Las vacunas génicas pueden a su vez clasificarse como replicativas, como sucede con los microorganismos mutados avirulentos, o no replicativas cuando se utilizan vacunas de ADN “desnudo” o con el empleo de vectores, aunque consideramos que estos últimos pudieran ser considerados replicativos.

Tabla 4,1. Características diferenciales de las vacunas “vivas” e inactivadas.

Vacunas de microorganismos vivos	Vacunas inactivadas
Atenuadas	A partir de microorganismos virulentos
Por lo general es suficiente con una dosis	Dosis múltiple, requieren refuerzos
Protección de larga duración	Protección de menor duración
Menos estables	Estabilidad mayor
No requieren adyuvantes	Generalmente necesitan adyuvantes
Pueden administrarse por vía natural	Por lo general se aplican por vía parenteral
Inducen anticuerpos y respuestas T citotóxicas	Inducen anticuerpos
Posible difusión de la infección entre no vacunados	No es posible la difusión de la infección a los no vacunados

Según sus objetivos, las vacunas pueden ser terapéuticas o preventivas, tal y como describimos al inicio de este capítulo, para lo cual es importante conocer el papel de los distintos efectores inmunitarios (Tabla 4,2). En el caso de las vacunas terapéuticas es de particular relevancia, y no limitadas a las enfermedades infecciosas, sino a otras entidades como el cáncer y la alergia. La efectividad del tratamiento en ellas depende en gran medida de la inducción de una adecuada respuesta inmune.

Tabla 4,2. Papel de las diferentes respuestas inmunitarias frente a la infección.

Respuesta	Previene la infección	Limita la difusión	Control/eliminación
Anticuerpos	+++	+++	+
Linfocitos T CD4+ Th1 / Macrófagos	—	++	++
Linfocitos T CD8+ citotóxicos	—	+	+++

Vacunas comercializadas

Para predecir el probable comportamiento de la inmunidad inducida por vacunas es necesario conocer las principales características de las que se emplean en los diferentes programas de vacunación.

Un cabal conocimiento de estas vacunas nos permite dirigir los estudios hacia los efectores de la respuesta inmune involucrados, conocer la duración de la inmunidad y por tanto valorar o no la necesidad de refuerzos. Un ejemplo de ello lo tenemos en las vacunas de polisacáridos, según estén o no conjugadas a una proteína portadora (Tabla 4,3).

Tabla 4,3. Principales diferencias inmunológicas entre vacunas de polisacáridos.

Categorías	No conjugadas (timoindependientes)	Conjugadas (timodependientes)
Memoria	NO	SI
Intensidad de la respuesta	Menor	Mayor
Duración de la respuesta	Menor	Mayor
Isotipo de anticuerpos	IgG2, IgM	IgG1, IgG3
Afinidad de los anticuerpos	Menor	Mayor
Inmunidad comunitaria	NO	SI
Hiporrespuesta	Posible	NO
Edad de inicio de la vacunación	Mayor de 2 años	Menor de 2 años

Debe prestarse una particular atención a la estabilidad del producto, para lo que deben seguirse las orientaciones del fabricante. La estabilidad varía según el inmunógeno vacunal; los agentes vivos son menos estables y muy dependientes de la temperatura y las condiciones generales de almacenamiento.

Vacunas en fase de investigación

En los últimos años se han desarrollado nuevas vacunas, aunque desgraciadamente son todavía poco numerosas; están basadas en los novedosos principios de síntesis química, el empleo de vectores vivos y vacunas de ADN (Tabla 4,4).

Algunos de estos candidatos vacunales han cumplido todos los requisitos regulatorios para su comercialización, en otros, como sucede con las vacunas de ADN, en las cuales se aplica no el inmunógeno, sino el gen que lo codifica, queda un largo trecho por recorrer, ya que existe el temor en cuanto a su seguridad, dado por el riesgo de que el ADN administrado se integre en el material cromosómico del hospedero y pueda causar mutaciones, así como la posibilidad de inducción de tolerancia; es decir ausencia de respuesta inmune adecuada ante

un inmunógeno específico, o también la producción de reacciones autoinmunes, por lo que se debe probar exhaustivamente la seguridad de estas vacunas. A pesar de esto constituyen una alternativa muy prometedora.

Un atractivo particular de estos nuevos candidatos vacunales lo constituye el estímulo tanto de la inmunidad humoral como la celular, con el objetivo de alcanzar una mejor protección, sobre todo contra agentes intracelulares en los que los mecanismos efectores mediados por linfocitos citotóxicos CD8+, y por linfocitos cooperadores CD4+ de la subpoblación Th1, así como por el macrófago activado como célula efectora, son necesarios para controlar la infección.

Tabla 4,4. Características de las vacunas en fase de investigación.

Propiedades	Síntesis química	Vectores vivos	Vacunas de ADN
Necesidad de refuerzos	Si	Posiblemente	Posiblemente
Estabilidad	Alta	Baja	Muy estable
Respuesta inmune	Humoral	Humoral y celular	Humoral y celular
Requieren adyuvantes	Si	No	No
Reversión	No	Posible	No

Se prevén, además, avances notables basados en el empleo de nuevos adyuvantes y métodos de distribución novedosos, tales como vacunas nasales, en aerosol, parches de piel transcutánea y vacunas en plantas transgénicas.

Vacunas en el siglo XXI

Las perspectivas de desarrollo en el campo de la vacunología son amplias, basadas en la introducción de las nuevas tecnologías.

Se augura un incremento notable del número de inmunógenos vacunales, nuevas estrategias de inmunización materna y del neonato, y aquellas dirigidas a prevenir enfermedades específicas en dependencia de la edad y el riesgo (Tabla 4,5).

En el caso de los países subdesarrollados, y teniendo en cuenta su cobertura sanitaria, particularidades geográficas, así como el carácter endémico o epidémico de la enfermedad, deberán incluirse vacunas dirigidas contra *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Shigella*, contra la fiebre tifoidea, la malaria y el dengue, entre otras enfermedades.

Probablemente deberán también mantener algunas estrategias particulares, como sería el caso de la vacuna oral de virus vivos atenuados contra la poliomielitis (OPV), o el enfoque de esquema combinado IPV + OPV que eliminaría la posibilidad de fallas de inmunidad y disminuiría el riesgo de poliomielitis paralítica asociada a la vacuna oral, que puede producirse al recuperar los virus su neurovirulencia, aunque la tendencia final será la sustitución de la vacuna oral por la parenteral (IPV) como en los países desarrollados.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado las vacunas según sus intereses y las potencialidades de empleo:

- Vacunas usadas con regularidad en el Programa Ampliado de Inmunización. Además de las seis vacunas básicas: contra la poliomielitis, tétanos, difteria, *pertussis*, sarampión y tuberculosis, se emplean vacunas para la prevención de la rubéola, parotiditis, hepatitis B y fiebre amarilla.
- Vacunas disponibles pero no ampliamente utilizadas en los países subdesarrollados: Hib, varicela, encefalitis japonesa, hepatitis A, fiebre tifoidea, vacunas contra neumococos y meningococos.
- Vacunas claves para estos países y que se encuentran en desarrollo o perfeccionamiento: VSR, rotavirus, *Shigella*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Vibrio cholerae*, VIH/SIDA, malaria, esquistosomiasis y dengue.

Tabla 4,5. Algunas vacunas que se aplicarán en este siglo.

Embarazo	Difteria, tétanos y <i>pertussis</i> acelular formulación para adultos (dTPa), estreptococos del grupo β , virus sincitial respiratorio (VSR), neumococos, gripe, parainfluenza
Neonatos	Tuberculosis (TB), VSR/parainfluenza, hepatitis B
Lactantes	Rotavirus y combinaciones pediátricas: DTPa/IPV/hepatitis B/ <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Hib), neumococos, meningococos, VSR/parainfluenza
1-2 años	Parotiditis, rubéola, sarampión, varicela (PRSV), gripe. Refuerzos
4-6 años	PRSV, <i>Streptococcus mutans</i> , enfermedad de Lyme, TB. Refuerzos
Adolescentes	VIH, herpes virus 2, virus de Epstein Barr, citomegalovirus, papilomavirus, parvovirus. Refuerzos
Adultos jóvenes	dTPa, meningococos, <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , vacunas del viajero según el área geográfica de destino. Refuerzos
Mayores de 55 años	Gripe, neumococos, herpes zoster, vacunas contra el cáncer. Refuerzos
Países subdesarrollados	<i>E. coli</i> enterotoxigénica, <i>Shigella</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , fiebre tifoidea, hepatitis A, fiebre amarilla, malaria, dengue, encefalitis japonesa, esquistosomiasis, TB

En el desarrollo de nuevas vacunas debemos destacar la táctica orientada a la prevención de las enfermedades de transmisión sexual, basada en la inmunización tan pronto comienza la vida sexual activa; así como el desarrollo que deberán alcanzar las vacunas contra el cáncer, tanto profilácticas como terapéuticas, que aunque pueden comenzar a aplicarse en edades tempranas, como sucede al inmunizar contra el virus de la hepatitis B o contra el papilomavirus humano, cobrarán una importancia particular en los individuos mayores de 55 años.

El aumento del número de inmunógenos vacunales obligará a incrementar todavía más la valencia de las vacunas combinadas, por lo que deberá estudiarse detalladamente la posible competencia entre los diferentes inmunógenos, determinada de una u otra forma por la inmunodominancia de los distintos epítomos o determinantes antigénicos presentes. Impulsará también el uso de nuevas vías de aplicación, fundamentalmente la de mucosas, y probablemente el empleo de vectores o vacunas de ADN.

En el desarrollo futuro de vacunas se trabaja intensamente en alcanzar una mayor estabilidad sin depender de la cadena de frío, lo que facilitaría la ejecución de programas de vacunación, sobre todo en los países con una economía menos favorecida.

El porvenir de la vacunación se vislumbra favorable, seremos testigos de una era de nuevas tecnologías y de vacunas novedosas que cambiarán el paradigma al que durante tantos años se ha limitado a las vacunas, que se diseñarán no sólo para la prevención de las enfermedades infecciosas o el tratamiento de las infecciones agudas, sino también en aquellos casos en que el agente ha establecido una infección crónica o latente. Entre los retos mediatos tenemos las vacunas preventivas frente al VIH, el dengue, la malaria y la tuberculosis.

Entre los candidatos para la vacunación terapéutica incluimos al VIH, el herpes simple y *Helicobacter pylori*. Veremos también un auge en el desarrollo de vacunas para la profilaxis y la terapéutica de un gran número de enfermedades no infecciosas.

Conclusión

Para normalizar inmunoensayos en este campo es necesario conocer a profundidad las vacunas a evaluar: su composición, los efectores de la respuesta inmune inducidos por ellas e identificar aquellos relacionados con la protección o acción terapéutica. De esta forma se podrá contar con técnicas optimizadas para el estudio clínico de vacunas e interpretar adecuadamente sus resultados.

Bibliografía

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai SH, editores: Inmunidad frente a los microorganismos. Capítulo 15. En: *Inmunología Celular y Molecular*, 6ta ed., Madrid: Elsevier; 2008, pp.351-73.
2. Greenwood B. Maternal immunisation in developing countries. *Vaccine* 2003;21:3436-41.
3. National Institutes of Health (US). *The Jordan Report 2000. Accelerated Development of Vaccines*. Bethesda: The National Institutes of Health; 2007.
4. Ochoa R, Sierra G, Martínez I, Cuevas I. Mecanismos de defensa frente a las infecciones (I). Fases de reconocimiento y activación de la respuesta inmune. Capítulo 2 En: *Prevención de la enfermedad meningocócica*. Ciudad de La Habana. Finlay Ediciones; 2010. p.31-41.
5. Ochoa R, Sierra G, Martínez I, Cuevas I. Mecanismos de defensa frente a las infecciones (II). Fase efectora de la respuesta inmune. Capítulo 3. En: *Prevención de la enfermedad meningocócica*. Ciudad de La Habana. Finlay Ediciones; 2010. p.43-57.
6. Ochoa R. Bosquejo del sistema inmune en la defensa frente a infecciones. Capítulo 2. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.5-23.

7. Ochoa R. Vacunas. Desarrollo actual y tendencias. Capítulo 3. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.24-30.
8. Plotkin SA. Vacunas en el siglo veintiuno. *Vacunas* 2002;3:18-28.
9. Plotkin SA. Vaccination against the major infectious diseases. *C R Acad Sci III* 1999;322:943-51.
10. Sadarangani M, Pollard AJ. Serogroup B meningococcal vaccines – an unfinished story. *Lancet Infect Dis* 2010;10:112-24.
11. Salleras L. Tecnologías de producción de vacunas I: vacunas vivas atenuadas. *Vacunas* 2002;3:29-33.
12. Salleras L. Tecnologías de producción de vacunas II: vacunas inactivadas. *Vacunas* 2002;3:78-84.
13. Salleras L. Tecnologías de producción de vacunas III: vacunas génicas. *Vacunas* 2002;3:145-49.
14. Siegrist CA. Vaccination in the neonatal period and early infancy. *Intern Rev Immunol* 2000;19:195-219.
15. World Health Organization. *State of the world's vaccines and immunization*. Geneva: The World Health Organization; 2010.

Capítulo 5

Evaluación de la inmunogenicidad de vacunas

Ensayos clínicos de vacunas preventivas. Clasificación

El desarrollo de una vacuna se inicia desde el momento en que surge la idea y termina con la entrega del producto terminado. El lapso de tiempo entre uno y otro puede abarcar fácilmente diez o más años y su costo asciende usualmente a millones de dólares.

Luego de surgida la idea de producir una vacuna contra determinada enfermedad, se inicia la investigación y el desarrollo de la sustancia activa; es decir, encontrar un inmunógeno que dentro de las fases de desarrollo demuestre ser capaz de producir una respuesta protectora.

Posteriormente se inicia todo el desarrollo clínico, se contemplan los aspectos de regulación y se inicia el proceso de fabricación a escala industrial.

En la fase exploratoria o preclínica, luego de la selección y producción a menor escala de los principios activos, se inician los estudios en animales para determinar seguridad, toxicidad por dosis única y repetida, tolerancia local, relación dosis/respuesta e inmunogenicidad, entre otros. Paralelamente a esta etapa preclínica, se van realizando los estudios fisicoquímicos, que incluyen pruebas de identidad del producto, caracterización molecular, estabilidad y consistencia.

Terminado este proceso, que puede durar muchos meses o años, se inicia la etapa de investigación clínica en seres humanos.

Los “ensayos clínicos de vacunas” son estudios sistemáticos en seres humanos con el fin de demostrar la seguridad, reactogenicidad, inmunogenicidad y protección de los productos biológicos que reúnen esa condición (ver glosario). Los términos “ensayo clínico” y “estudio clínico” son sinónimos.

Los ensayos clínicos de vacunas preventivas se clasifican generalmente en cuatro fases. No es necesario delimitar con precisión las líneas divisorias, cada una de estas fases es funcional y los términos no son definidos sobre una estricta base cronológica. De hecho algunas fases durante la estrategia de evaluación clínica pueden superponerse (por ejemplo, estudios fase I/II, fase II/III). De forma muy breve expondremos sus características y el papel que juega la evaluación de la inmunogenicidad en ellas.

La fase I comienza con la administración inicial de un nuevo candidato vacunal a humanos e intenta determinar la tolerabilidad local y sistémica del rango de dosis necesario para continuar los estudios clínicos y determinar la naturaleza de las reacciones adversas que pueden esperarse. Los estudios de seguridad comparativa deben ser aleatorizados, a ciegas y controlados, para garantizar la validez de las observaciones. Se emplea un pequeño número de voluntarios. Además, una información preliminar de la inmunogenicidad de la vacuna se puede obtener a través de inmunoensayos apropiados.

Los estudios de fase II, también controlados, aleatorizados y a ciegas, tienen como objetivo primordial estudiar la inmunogenicidad, lo que caracteriza esta fase, aunque no limitada a ella. Además, se evalúa el esquema de inmunización, la reactogenicidad y duración de la protección, relacionados con variables como edad, sexo u otras en centenares de voluntarios, asignados a grupos que permitan la evaluación estadística de los resultados.

Estos ensayos han sido subdivididos en fase II-a, diseñados para determinar la reactogenicidad, inmunogenicidad y el mejor esquema de inmunización, incluidas las dosis, vía e intervalo entre las dosis; y en fase II-b, ensayos que permiten la evaluación preliminar de la eficacia, en particular cuando es posible llevar a cabo estudios de reto contra determinados microorganismos bajo condiciones controladas. Para estos estudios se requieren lotes elaborados bajo normas de Buenas Prácticas de Producción. Debe haber una definición clara de la formulación y de los adyuvantes utilizados.

Los ensayos clínicos fase III son estudios cuyo objetivo principal es confirmar la eficacia terapéutica del producto en investigación con lotes fabriles. Son diseñados para confirmar las evidencias acumuladas en la fase II para la indicación propuesta y la población receptora. Se trata de estudios bien controlados, aleatorizados y a ciegas, en los que participan miles de personas, dependiendo de la incidencia esperada de la enfermedad u otra condición asociada al agente causal, con la intención de suministrar la información adecuada para poder obtener el registro para su comercialización. Los participantes son aleatoriamente asignados a un grupo experimental o de control y seguidos durante un tiempo. Se determina por lo general la eficacia de la vacuna evaluando la incidencia de la enfermedad en ambos grupos.

Los estudios fase III pueden utilizarse para valorar, entre otros, la relación dosis-respuesta y explorar el uso del producto en extensas poblaciones, estados fisiológicos especiales e interacción con otras vacunas o medicamentos. La detección de los niveles de inmunorrespuesta a la vacunación, generalmente en una submuestra por motivos de costo, permite determinar la relación entre estos niveles y el grado de protección.

Cuando se conoce el nivel protector de anticuerpos, un estudio de inmunogenicidad puede ser suficiente para avalar la eficacia clínica, sobre todo en el caso de candidatos vacunales que cuenten con comparadores activos de similar composición y con un diseño estadístico de no-inferioridad. Esta estrategia tiene una importancia particular si la incidencia de la enfermedad evaluada es baja, dificultando la ejecución de estudios de campo (Tabla 5,1).

Tabla 5,1. Mediciones del efecto protector de una vacuna.

Estudios de campo	Inferida de la inmunogenicidad
Basados en la ocurrencia de casos de la enfermedad de interés u otra condición asociada al agente causal, por ejemplo, portador o infección subclínica	Proporción de sujetos vacunados que alcanzan un nivel de anticuerpos asociado a protección

Los voluntarios que participan en estos ensayos son siempre sujetos sanos, a menos que sean vacunas terapéuticas; se tiene en cuenta su interés expreso de participar en el estudio y solo después de obtener su conformidad a través del consentimiento informado.

Una vez aprobada una vacuna para su comercialización, se hace indispensable la ejecución de programas de vigilancia epidemiológica y farmacológica, que permitan evaluar tanto su efectividad como su seguridad, ya que las diferencias individuales pueden provocar respuestas inmunes inadecuadas y reacciones adversas no detectadas durante los ensayos clínicos precedentes, aún cuando hayan sido desarrollados sobre un número significativo de individuos. Se realizan entonces los estudios de fase IV, estudios de poslicenciamiento o poscomercialización, que se basan en el monitoreo sistemático del comportamiento de la vacuna donde ha sido aplicada, incluida la evaluación de la respuesta inmune inducida por la misma, usualmente inferior a la observada en los estudios experimentales.

No deben confundirse la efectividad o impacto de una vacuna, evaluada en la práctica clínica habitual, con la eficacia, determinada en condiciones ideales en los ensayos clínicos fase III. Una buena eficacia no siempre implica buena efectividad.

La clasificación en las fases de desarrollo descritas no proporciona realmente la mejor base para el análisis, debido a que un tipo de ensayo puede ocurrir en varias fases. El concepto de fases está relacionado más bien con una descripción que con un conjunto de requerimientos. Las fases temporales no implican un orden fijo de estudios, ya que en algunos la secuencia típica no será apropiada o necesaria.

En la actualidad se prefiere hablar de tipos de estudios según los objetivos, en lugar de fases, así tendremos estudios de seguridad, reactogenicidad, inmunogenicidad y eficacia (Figura 5,1).

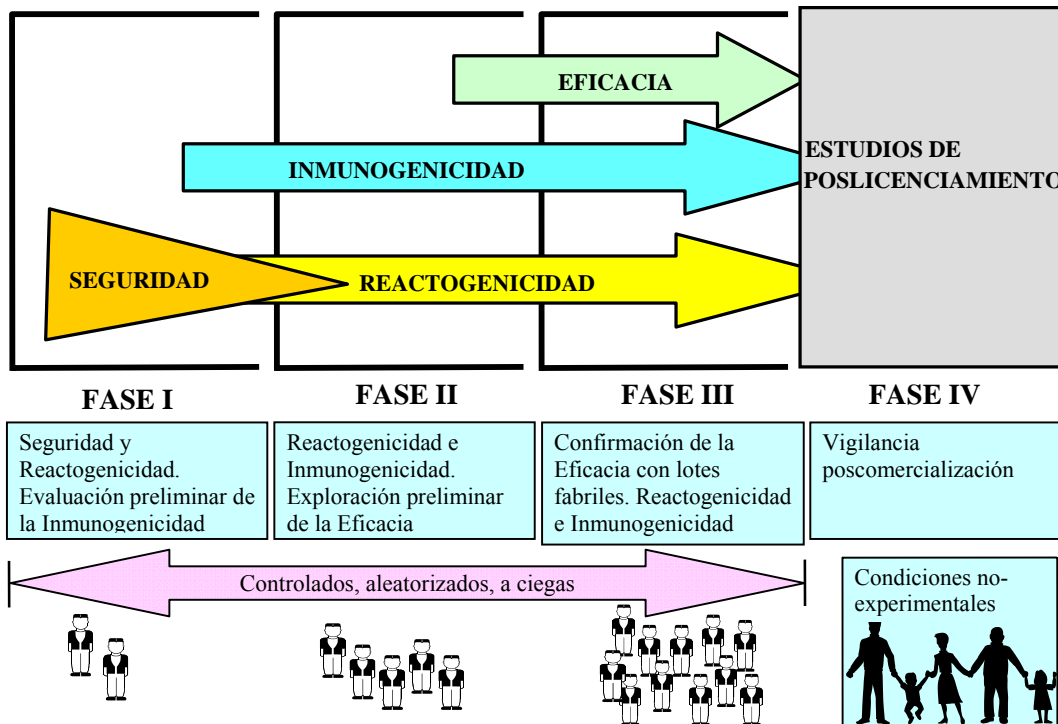


Figura 5,1. Tipos de estudios y fases de los ensayos clínicos.

Características generales de los estudios de inmunogenicidad

Deberán tenerse en cuenta las consideraciones siguientes:

1. Los estudios de inmunogenicidad de las vacunas preventivas en las fases experimentales, deben ser aleatorizados, controlados y generalmente en voluntarios sanos.
2. Se realizarán evaluaciones para conocer el esquema de inmunización óptimo. Se incluye la realización de ensayos dosis/respuesta, haciendo énfasis en la evaluación del intervalo óptimo entre las primeras inmunizaciones y las dosis de refuerzo, cuando proceda.
3. La vacuna en estudio deberá ser la misma que la que será comercializada y evaluada frente a las existentes.
4. La inmunogenicidad deberá ser estudiada en grupos cuyas edades correspondan con las indicaciones del producto. Es necesario tener en cuenta las diferencias inmunológicas acordes con la edad.
5. En general deben excluirse los sujetos alérgicos a los componentes de la vacuna, las embarazadas, sujetos con procesos febriles o infecciosos, enfermedades crónicas y aquellos bajo tratamiento inmunomodulador.
6. Al inicio del estudio (antes de la vacunación) deberán tomarse las muestras pertinentes para la evaluación de los efectores de la respuesta inmune involucrados, como es el caso de obtención de suero para titulación de anticuerpos.
7. Se realizará una nueva toma de muestra entre 15 y 30 días después de finalizada la vacunación.
8. Deberá comprobarse una significativa seroconversión, considerando las diferencias entre los títulos inicial y final. Se determinará el porcentaje de individuos con seroconversión, así como la media geométrica de los títulos y los intervalos de confianza al 95%. Es importante establecer en la hipótesis del protocolo del estudio el nivel de la diferencia que se debe evaluar, para calcular el tamaño de la muestra.
9. Es conveniente, además, establecer la relación entre el nivel de la respuesta inmune y la protección conferida por la vacuna, o sea, el correlato de protección o protección correlativa. Es preferible emplear la seroprotección para el análisis de los resultados, como describiremos en los “criterios de evaluación”.
10. En el caso de vacunas conocidas o cuando se efectúen cambios en el proceso de producción, al menos un lote deberá ser evaluado clínicamente.
11. Para el caso de vacunas combinadas, se recomienda que los estudios se diseñen de manera tal que la inmunogenicidad en la combinación pueda compararse con la inducida por cada uno de sus componentes por separado. Cuando se cuenta con una vacuna multivalente comercial de igual composición, puede usarse como comparador activo para cada uno de los inmunógenos evaluados.

Tipos de estudio para evaluar la inmunogenicidad

1. Ensayo de superioridad: Su objetivo primario es demostrar que la inmunogenicidad de la vacuna en estudio (experimental) es superior a la vacuna control o placebo. Siempre es preferible el uso de una vacuna en lugar de un placebo inerte, de esta forma todos los individuos alistados en un ensayo clínico reciben algún beneficio de su participación. Un placebo inerte sólo debe usarse cuando esté justificado éticamente, como pudiera ser, utilizar para este fin el diluyente de una vacuna oral líquida. El ensayo de superioridad es empleado cuando no se dispone de una vacuna de similar composición que pueda usarse como comparador activo.
2. Ensayo de equivalencia: Es aquel cuyo objetivo primario es demostrar que la respuesta inmune inducida por la vacuna en estudio es similar a una vacuna control. Es decir, cuando se encuentra comprendida entre márgenes de equivalencia, superiores e inferiores, clínicamente aceptables.
3. Diseño de no-inferioridad: Es el recomendado para evaluar la inmunogenicidad cuando se cuenta con comparadores activos. Es un ensayo de equivalencia unilateral; su objetivo primario radica en demostrar que la respuesta inmune de la nueva vacuna no es inferior, dentro del margen establecido, a una vacuna comercial empleada como comparador activo. El investigador deberá definir con claridad dicha diferencia o límite de no-inferioridad, para lo cual tiene que precisar los porcentajes de seroconversión o seroprotección estimados para ambas vacunas. Se recomienda que dicho límite no supere el 10%. Este estudio puede incluir un placebo inerte u otra vacuna utilizada como comparador pasivo; de esta forma, al establecerse la superioridad de la vacuna en estudio con respecto a los anteriores, podrá validarse el ensayo y evaluar con más seguridad el grado de similitud con el comparador activo.

Por último, recalcar que no debe verse la evaluación de la inmunogenicidad como un elemento aislado en el desarrollo clínico de vacunas, sino imbricado de forma indisoluble con el resto de sus componentes.

Reporte de los resultados

El reporte de los resultados de las técnicas de laboratorio usadas para evaluar la inmunogenicidad de vacunas, puede darse en forma **cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa**; aunque siempre es preferible diseñar ensayos cuantitativos, en particular cuando se emplea el ELISA, aun cuando la interpretación final en algunos casos se realice en términos cualitativos, al determinar la seroconversión inducida por una vacuna.

El desarrollo de técnicas cuantitativas se basa en curvas “dosis/respuesta”, lo que es difícil, ya que las curvas de calibración son sigmoidales y su parte más sensible es la pequeña zona de mayor pendiente, como profundizaremos en el siguiente acápite. Además de esta limitación, las curvas de anticuerpos son complicadas ya que son difíciles de describir con la ley de acción de masas, porque no es predecible la avidéz ni la cantidad real de los inmunoreactantes.

Métodos para expresar los resultados de las técnicas inmunoenzimáticas

1. **Titulación:** La muestra se diluye de forma seriada hasta el límite en el cual la reacción enzimática no pueda ser detectada. La intersección de la curva con el valor de corte establecido da el título. Este método es laborioso, costoso y menos exacto que otros procedimientos.
2. **Dosis efectiva:** La principal diferencia con el método anterior está dada en que la estimación se hace en la parte lineal de la curva sigmoidal. Es un método más exacto pero muy trabajoso.
3. **Valor de lectura:** Los resultados habitualmente son expresados en valores de absorbancia cuando se usan sustratos cromogénicos, o en unidades arbitrarias de fluorescencia cuando se emplean sustratos fluorogénicos. Sin embargo, este proceder no es muy confiable, los valores de absorbancia o fluorescencia no son proporcionales a los títulos y la imprecisión interensayo es elevada.
4. **Respecto a una muestra de referencia:** Se han empleado diferentes procedimientos para normalizar los resultados, entre ellos las razones entre las muestras y la referencia negativa o positiva, y el calculado a partir de las áreas bajo la curva de la muestra estudiada y la curva de referencia. Los primeros son relativamente sencillos, pero los resultados no son linealmente proporcionales a los títulos. El último método requiere diluciones seriadas de la muestra, lo que lo hace engorroso y costoso.
5. **Múltiplo de la actividad normal:** Se define como el número de veces que la muestra debe diluirse con respecto a la referencia para obtener su misma señal. Se asume que las curvas son paralelas y la pendiente por tanto puede ser calculada con un análisis de regresión. Este procedimiento es relativamente lineal y su detectabilidad es elevada. Sin embargo, es muy dependiente del material biológico de referencia y el rango útil de la curva es pequeño.
6. **Percentil estimado con respecto a muestras de referencia:** Se obtiene una distribución de frecuencias acumulativas de un panel de más de 100 muestras normales, con las que se comparan las muestras estudiadas. Este método tiene como limitante que sus resultados no son proporcionales a los títulos y el panel de referencia tiene que ser cuidadosamente seleccionado.
7. **Expresión de las curvas “dosis/respuesta” en unidades estándares:** La curva obtenida mediante el “ploteo” de los títulos de varias muestras o puntos de una curva, que abarquen desde valores negativos hasta fuertemente positivos, contra sus valores de lectura, permite su transformación en unidades cuantitativas. Deben prepararse estándares a partir de mezclas de diferentes muestras (sueros u otro material biológico), garantizando así un comportamiento paralelo. Si una sola muestra es empleada, lo que no es recomendado, hay que verificar rigurosamente su paralelismo con otros antisueros. El uso de estándares para la construcción de las curvas y muestras controles para la calibración interna, garantizan la consistencia analítica. Este método, que recomendamos, tiene las ventajas de que se requiere generalmente una sola dilución, que los resultados son proporcionales a los títulos y los resultados se dan en una escala continua; se expresan en unidades arbitrarias (U/mL), en

unidades de masa, usualmente $\mu\text{g/mL}$, o unidades internacionales (UI/mL), previa calibración contra estándares de referencia.

Las curvas de calibración en los ELISAs no son lineales y para obtener la función precisa, una o ambas variables requieren ser transformadas mediante diferentes modelos, entre los que señalamos:

- Regresión parabólica.
- Regresión polinomial.
- Regresión lineal ponderada después de transformación logit-log.
- Regresión lineal no ponderada después de transformación logit-log.
- Función logit-log de cuatro parámetros.

La función logit-log de cuatro parámetros es muy usada para representar los datos de curvas de calibración de al menos cinco puntos, que se construyen habitualmente usando dos técnicas de ajuste: estimación no ponderada de mínimos cuadrados y estimación robusta ponderada de mínimos cuadrados, usando diferentes algoritmos; entre los más empleados están el de linealización de Taylor y el de Marquardt. La no ponderada estima los parámetros sin tener en cuenta las posibles diferencias en la variabilidad de las mediciones de punto a punto y puede afectarse por observaciones anómalas. La ponderada ajusta cada observación de forma individual y analiza los valores observados y esperados para cada punto, de esta forma influyen menos los valores aberrantes.

Criterios de evaluación de los resultados

Se usan generalmente dos criterios: valoración del incremento de los títulos de anticuerpos inducidos por un candidato vacunal y estimación del grado de protección alcanzado, siempre y cuando puedan establecerse apropiados correlatos de protección.

Cuando no se conoce con exactitud cuál es el nivel de protección, se estudia la respuesta pre y posvacunación. Esto puede hacerse simplemente aplicando las pertinentes pruebas estadísticas según el tipo de variable empleada, aunque habitualmente se analiza la seroconversión, definida como un aumento significativo de los títulos. Con frecuencia se ha usado un incremento de cuatro, pero este valor depende realmente de la precisión del método. Las técnicas semicuantitativas deben mantener dicho criterio; sin embargo, no deben extrapolarse a otras cuantitativas, tales como el ELISA, técnica de gran precisión, para las cuales duplicar los valores de actividad o concentración pudiera ser suficiente.

En los ensayos clínicos de vacunas con valores establecidos para la protección, se pueden analizar los resultados sin la necesidad incluso de parear las muestras; de esta forma se calculan las medias geométricas e intervalos de confianza al 95% de cada distribución, previa normalización logarítmica, teniendo en cuenta que los efectores de la respuesta inmune en un contexto poblacional se distribuyen generalmente de forma no-gaussiana, y se determina el porcentaje de individuos protegidos o no. Se estima, entonces, si existen o no diferencias entre la respuesta inmune inducida por la vacuna y la respuesta basal existente antes de iniciar el esquema de inmunización. En ocasiones puede establecerse un gradiente de concentración que permite clasificar a los individuos por grado de protección, como se

obtiene con los ELISAs para cuantificar antitoxina tetánica o diftérica, o anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

Cuando no se hayan establecido los niveles de anticuerpos que correlacionen con protección, deben evaluarse los resultados con un enfoque cualitativo, como ya señalamos (Tabla 5,2). En todo caso, además de calcular el porcentaje de individuos que seroconvierten o están protegidos, deben estimarse los intervalos de confianza de proporciones.

Tabla 5,2. Criterios de evaluación de los resultados.

Seroconversión	Seroprotección
Incremento de los niveles de anticuerpos posvacunación con respecto a los existentes antes de vacunar	Cuando los resultados de la técnica empleada correlacionan con protección; estimada con respecto a ensayos in vivo, in vitro funcionales o estudios inmunoepidemiológicos

Las pruebas de hipótesis se emplean también con el objetivo de determinar la existencia o no de diferencias significativas para un grado de probabilidad determinado, generalmente del 5%, en diferentes tiempos de un estudio longitudinal o cuando se comparan diferentes muestras. El valor P es la probabilidad de obtener un estadígrafo igual o mayor que el calculado con los datos, suponiendo que en realidad no hay diferencia entre los grupos. En otras palabras, el valor P es la probabilidad de equivocarse al afirmar que existe una diferencia verdadera. Así, si este valor es mayor al 5% ($P > 0,05$) no rechazamos la hipótesis nula y concluimos que los grupos comparados son estadísticamente similares, según los enunciados establecidos en cada caso.

Sin embargo, la estimación de los intervalos de confianza es extremadamente útil, y aunque las pruebas de hipótesis mantienen su vigencia, en la investigación biomédica es más importante conocer la magnitud de la diferencia y no una simple indicación de si esta es o no estadísticamente significativa. Debe tenerse en cuenta que pequeñas diferencias sin interés real pueden ser significativas, mientras que efectos clínicamente importantes pueden no serlo. Por otra parte, la determinación de un intervalo de confianza y la realización de una prueba bilateral de hipótesis son dos procedimientos estadísticos estrechamente relacionados. Cuando se determina el intervalo de confianza, es posible deducir el resultado de la prueba de hipótesis al nivel correspondiente de significación estadística.

Conclusión

La evaluación de la inmunogenicidad de vacunas se realiza a lo largo de su desarrollo clínico; para ello, se requiere contar con inmunoensayos adecuados para estimar la seroprotección o la seroconversión de los efectores de la respuesta inmune inducidos, e identificar las diferencias entre los grupos experimental y control. Por otra parte, la eficacia de una vacuna puede inferirse de un estudio de inmunogenicidad cuando se conoce el correlato de protección. Debe mantenerse la evaluación de la respuesta inmune durante el poslicenciamiento.

Bibliografía

1. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Assessment of efficacy. Part 3. En: *Note for Guidance on Clinical Evaluation of New Vaccines*. London: EMEA; 1999. p.3-7.
2. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Methodological considerations. Part 4. En: *Note for Guidance on Clinical Evaluation of New Vaccines*. London: EMEA; 1999. p.7-11.
3. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Special considerations for combined vaccines. Part 5. En: *Note for Guidance on Clinical Evaluation of New Vaccines*. London: EMEA; 1999. p.11-12.
4. Ochoa R. Evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas preventivas. Capítulo 5. En: *Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.68-82.
5. Ochoa R. Principales técnicas de laboratorio para explorar la inmunidad poblacional. Capítulo 5. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.39-48.
6. Ochoa R. Importancia de la inmunoepidemiología en la vacunología. Capítulo 6. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.49-57.
7. Ochoa R, Baró IM, Menéndez J, Triana T, Mirabal M, Armesto M, et al. Reactogenicidad e inmunogenicidad de una nueva vacuna de toxoide tetánico y diftérico con concentración reducida en adolescentes cubanos. *VacciMonitor* 2006;15(2):13-7.
8. Ochoa R, Martínez JC, Ginebra M, Ferriol X, Rodríguez V, Sotolongo F. "Immunogenicity of a New *Salmonella* Typhi Vi Polysaccharide Vaccine –vax-TyVi– in Cuban School Children and Teenagers", *Vaccine* 2003;21:2758-60.
9. Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. "Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods to Quantitate *Neisseria Meningitidis* Group A ride Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", *J Polysaccha Clin Microbiol* 1991;29:1439-46.
10. Tijssen P. "Processing of Data and Reporting of Results of Enzyme Immunoassays", en: Burdon R.H., van Knippenberg P.H., editors: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. London: Elsevier; 1993. p.385-421.
11. Urange R, Mirabal M. Elementos esenciales a considerar en los ensayos de no inferioridad. *VacciMonitor* 2006;15(3):21-4.
12. World Health Organization. Preclinical and laboratory evaluation of vaccines. Part A. En: *Annex 1. Guidelines on Clinical Evaluation of Vaccines. Regulatory Expectations*, Geneva: The World Health Organization; 2004. p.49-54.
13. World Health Organization. Clinical evaluation of vaccines. Part B. En: *Annex 1. Guidelines on Clinical Evaluation of Vaccines. Regulatory Expectations*, Geneva: The World Health Organization; 2004. p. 55-92.

Capítulo 6

Estudios inmunoepidemiológicos en vacunología

Inmunoepidemiología. Disciplina integradora

La inmunoepidemiología no es una simple unión formal entre la inmunología y la epidemiología, la primera enfocada al estudio de la inmunidad y la segunda orientada fundamentalmente hacia poblaciones más bien que a los individuos.

La inmunoepidemiología, que incluye la seroepidemiología como una subdisciplina, está orientada a la vigilancia de las enfermedades e investiga la influencia de la inmunidad poblacional sobre diferentes patrones epidemiológicos. El chequeo de esta inmunidad a intervalos regulares permite la estimación del impacto social, médico y económico de las enfermedades, sobre todo las infecciosas; la planificación y evaluación de los programas de intervención, el reconocimiento rápido y la investigación de las enfermedades emergentes, así como el descubrimiento de genotipos resistentes a los mecanismos inmunes.

Esta nueva disciplina, aunque surgió de los estudios sobre infecciones parasitarias, se ha extendido al estudio del comportamiento de la inmunidad ante diferentes microorganismos, así como hacia las enfermedades no transmisibles. Sin embargo, la inmunoepidemiología es especialmente útil para la evaluación y el control de las enfermedades prevenibles por vacunas.

La inmunidad poblacional ante un agente biológico en particular, es un importante factor a tener en cuenta para evaluar el comportamiento de una enfermedad infecciosa. Otros factores incluyen la vía de transmisión, el genotipo del agente y su patogenicidad, incluyendo la evasión de los mecanismos inmunes. Por otra parte, la inmunidad depende en gran medida de la composición genética de la población, sus condiciones socioeconómicas, historias previas de infecciones, así como la existencia o no de eficaces programas de vacunación.

Para el desarrollo de esta disciplina es importante saber los mecanismos celulares y moleculares relacionados con la infección, que permitan reconocer la inmunidad adquirida por la vacunación o la existente en individuos recuperados, así como los mediadores de la respuesta inmune presentes en la fase aguda de la enfermedad. También es necesario tener en cuenta las características de la infección, entre las que se destacan la intensidad del estímulo inmunogénico, la vía de transmisión, la mezcla o no de genotipos y la presencia o no de reactividad cruzada y competencia entre diferentes cepas.

La inmunidad poblacional depende de la individual, de ahí que sea necesario definir los marcadores inmunológicos apropiados que se correlacionen con la protección, o con la reducción de la infectividad del microorganismo o su transmisión. Para ello, es necesario comprender detalladamente la relación causa-efecto entre la infección producida por un agente biológico y los mecanismos de defensa del hospedero.

Los estudios inmunoepidemiológicos pueden ser transversales o longitudinales; los primeros son útiles para evaluar la inmunidad inducida por vacunación, así como por

infecciones bacterianas o virales en las que la presencia de anticuerpos indique infección pasada y recuperación. Sin embargo, en el caso de infecciones parasitarias se sugiere el empleo de estudios longitudinales, teniendo en cuenta su persistencia, sus bajos niveles de inmunidad y la variación antigénica que modifica la respuesta inmune. Los estudios longitudinales son también útiles en la evaluación de infecciones por otros agentes infecciosos con características similares a las descritas, así como para la predicción de la duración de la inmunidad inducida de forma natural o artificial.

La inmunoepidemiología depende en gran medida del desarrollo y el empleo de métodos matemáticos y estadísticos complejos, ya que el sistema inmune se comporta habitualmente de forma no-lineal y con distribuciones no-gaussianas, acentuado por múltiples efectos de interacción entre los propios elementos del sistema, el agente biológico y el medio ambiente.

Mediante la combinación de la inmunología y la epidemiología se puede estimar el papel real de la inmunidad en la prevención de enfermedades, distinguir entre la exposición al agente infeccioso y la enfermedad, así como explicar su comportamiento epidemiológico.

Una minuciosa comprensión de la inmunidad adquirida por vacunas o por la infección, así como de las implicaciones sobre la cadena de transmisión y los mecanismos de resistencia contra los efectores del sistema inmune, es importante para la planificación de programas efectivos de intervención.

Inmunoepidemiología y estrategias de vacunación

La decisión de incluir determinadas vacunas en los programas de inmunización depende de una u otra forma de las características inmunes de la población, propiedades del agente infeccioso, su circulación, las probabilidades de diseminación, así como la existencia de medidas de control apropiadas y el entorno político, económico, geográfico, raíces culturales y nivel educacional.

Sin embargo, el estudio de la inmunidad poblacional es imprescindible para evaluar la eficacia de un esquema de vacunación establecido, definir la necesidad de modificar los protocolos primarios de inmunización, incluir refuerzos apropiados o disminuir la periodicidad de su aplicación.

La selección de un inmunógeno vacunal está relacionada con la vertiente del sistema inmune más idónea para prevenir la infección, incluyendo los mecanismos implicados en la vía de entrada del agente biológico y los órganos diana. De todo ello depende la metodología que debe emplearse para el control de la inmunidad.

La inmunoepidemiología cobra una particular importancia cuando se observa que la respuesta contra inmunógenos obtenidos de cepas con un genotipo determinado, induce insuficiente reactividad cruzada; en estos casos debe incrementarse la vigilancia dirigida a la circulación de otras cepas del mismo microorganismo, con peligro potencial de epidemias, y por otra parte orienta a la selección de una cepa vacunal más apropiada. Debe también controlarse la ocupación del nicho ecológico por otros gérmenes, una vez alcanzada la inmunidad posvacunación, incluido los casos en que se elimine el estado de portador.

En determinadas circunstancias puede surgir la necesidad de modificar los programas de vacunación existentes, mediante la sustitución de unas vacunas por otras con características diferentes, según las condiciones particulares de un país o región, el agente, su patogenicidad y la inmunidad que se desee inducir, de mucosa o sistémica, con timodependencia, a predominio de la inmunidad humoral o celular. Es el caso de las estrategias diferentes contra la poliomielitis, en que los países desarrollados, con elevadas coberturas de inmunización, han incluido la vacuna IPV combinada con otros inmunógenos, para --como ya se discutió en capítulos precedentes--, disminuir los riesgos de parálisis inducida por la OPV que, por otra parte, continúa siendo la más empleada en los países subdesarrollados para eliminar este flagelo; vacuna de fácil aplicación e inductora de una excelente inmunidad de mucosas, acorde con la vía de entrada del poliovirus.

Inmunoepidemiología en la emergencia y reemergencia de enfermedades

La vigilancia inmunoepidemiológica es útil para el análisis de la emergencia y reemergencia de enfermedades. En la prevención de estas últimas es vital la detección de grupos susceptibles, para de esta forma emplear el arsenal inmunoproláctico pertinente.

Se entiende por enfermedades reemergentes aquellas que en su momento dejaron de ser un problema de salud, producto de los progresos en su control y prevención, y que al romperse el equilibrio entre el agente causal y estas medidas, debido a: pérdida de inmunidad, resistencia antibiótica, detrimento de los sistemas de salud o al cambio climático, surgen nueva y habitualmente de forma más severa o con características cualitativas diferentes. Para el mundo actual es una preocupación la aparición de enfermedades reemergentes prevenibles por vacunación.

La importancia de la inmunoepidemiología en la vacunología puede ser mejor comprendida al analizar la reemergencia de la difteria, enfermedad bacteriana en la que las manifestaciones clínicas resultan de la acción de una sustancia extracelular (exotoxina) producida por *Corynebacterium diphtheriae*.

La letalidad de la difteria se debe a su toxina y la inmunidad contra la misma es mediada por anticuerpos, principalmente de clase IgG, a los cuales se les llama antitoxina. La enfermedad puede aparecer también en personas previamente vacunadas, de aquí que el conocimiento de la duración de la inmunidad sea de crucial importancia para el diseño de programas de vacunación efectivos.

Para la difteria existe una buena correlación entre la protección clínica y la presencia de antitoxina en suero, ya sea por la enfermedad, el estado de portador o por la inmunización con el toxoide. Por técnicas de neutralización in vivo se consideran absolutamente no protectores las concentraciones de anticuerpos menores de 0,01 UI/mL (Unidad Internacional por mililitro). Niveles no adecuados o no confiables para conferir protección entre 0,01 y 0,10 UI/mL, mientras que son necesarios títulos mayores (>0,10 UI/mL) para una protección confiable. Siendo este último el valor de corte cuando se utilizan técnicas inmunoenzimáticas para su evaluación. La mayor parte de los autores considera que los niveles >1,0 UI/mL corresponden a una protección confiable de larga duración.

En la aparición de brotes epidémicos han incidido varios factores, entre ellos la ausencia de un adecuado nivel inmunitario en la población, la magnitud de la exposición y virulencia

del bacilo de la difteria, así como la deficiente situación socioeconómica, que por una parte limita las campañas de vacunación y por otro hace críticas las medidas higiénico-epidemiológicas necesarias para limitar la enfermedad. De ahí que la difteria estuviera restringida por mucho tiempo a la población menor de 15 años en los países subdesarrollados.

Se puede decir que los que sobreviven a esta enfermedad en los países más pobres adquieren la inmunidad de forma natural, la cual se mantiene por la exposición inmunogénica continuada, por lo que prácticamente no aparecen brotes epidémicos más allá de la adolescencia. Sin embargo, en los países con apropiadas políticas de salud, se alcanzan altos niveles de inmunización en niños, que han provocado la disminución de la circulación del *C. diphtheriae*, por lo que hay menos posibilidades de reforzar la inmunidad por exposición natural, apareciendo grupos de individuos adultos no inmunes con condiciones ideales para brotes epidémicos.

En las décadas de 1980 y 1990 se detectó que en algunos países industrializados, menos del 50% de los adultos presentaban una adecuada inmunidad contra la difteria. Los grupos de edad con los valores más bajos de antitoxina diftérica correspondían a los adultos entre 20 y 40 años de edad en Alemania y Japón, los de 40 a 50 años en Australia e Inglaterra y en los mayores de 50 años en Dinamarca, Finlandia, Suecia y EUA. A pesar de ello no ocurrieron brotes epidémicos en estos países, lo que está relacionado con condiciones económicas favorables y la inmediata implementación de un programa de vacunación con la formulación para adultos de la vacuna bivalente de toxoide tetánico y diftérico. Sin embargo, en las antiguas repúblicas soviéticas, principalmente en la Federación Rusa, ocurrieron brotes epidémicos de difteria, que se asociaron principalmente a los bajos niveles de inmunidad de estas poblaciones. Estos brotes se expandieron como pólvora a los países vecinos de Europa Oriental.

En estos países disminuyó la cobertura de inmunización, quedando la población infantil desprotegida. También quedaron vulnerables los adultos, que perdieron su inmunidad contra la difteria como consecuencia de los programas de inmunización vigentes durante el período socialista, limitados a la población infantil. En esa etapa prácticamente se suprimió la circulación del *C. diphtheriae* y por ende la estimulación natural, que sí está presente en muchos países del Tercer Mundo. La disminución de la inmunidad en la población adulta, junto al deterioro de las condiciones sanitarias derivadas de la situación socioeconómica, crearon el medio óptimo para la diseminación de enfermedades. En 1980 Europa era responsable de menos del 1% del total de casos mundiales de difteria. En 1994 reportó cerca del 90% de los casos, la inmensa mayoría en la Federación Rusa (80%) y otros países de la antigua URSS y del este europeo.

En épocas precedentes se crearon condiciones similares, que nos permitieron comprender la influencia de estos factores de riesgo en brotes de diferentes enfermedades. La peste bubónica diezmó la Europa Medieval. En la Primera Guerra Mundial se solapó otro conflicto, entre el virus de la influenza y la humanidad, en el que murieron millones de personas. La reconcentración en la guerra de independencia cubana, desató en 1898 una gran epidemia de cólera en La Habana, en la que murieron un sinnúmero de personas.

En la Cuba prerrevolucionaria, la difteria constituía un azote en la población infantil, dada las pésimas condiciones en la infraestructura socioeconómica prevaleciente en la mayoría de la población. En la etapa revolucionaria se establecen estadísticas confiables, observándose en 1962 elevados valores de morbilidad (1469 enfermos) y mortalidad (75 fallecidos), año en

el que se iniciaron las campañas de vacunación. En 1964 la cobertura de inmunización ascendió al 60%, en 1970 solo se reportaron 7 casos de difteria con 1 fallecido, y ya en 1974 la vacunación abarcó al 75–80% de la población. A partir de 1980 no se reportan enfermos ni muertes por difteria como consecuencia de la política inmunitaria y otras medidas de control. Es interesante observar cómo el aumento de la cobertura de inmunización y del control epidemiológico, se traduce en cambios progresivos, dados por una disminución primero de la morbilidad y mortalidad y luego la desaparición de la enfermedad.

La ausencia de la enfermedad en Cuba propicia la pérdida de la reestimulación natural y la aparición de individuos no inmunes, tal y como sucedió en aquellos países con políticas de inmunización similares; si a ello añadimos que en el último decenio del siglo XX se introdujeron cambios notables en prácticamente todas las esferas de la sociedad, dada por las dificultades económicas y las sociales como consecuencia de la desaparición del Campo Socialista Europeo, la URSS y el bloqueo económico, impuesto por Estados Unidos, es fácil comprender la necesidad de conocer la existencia o no de poblaciones vulnerables, para lo cual se diseñaron diferentes estudios seroepidemiológicos.

En 1999 se estudió una muestra representativa de la población del municipio Alquízar, en la provincia cubana de Artemisa (Peña, 1999), para evaluar los niveles de antitoxina tetánica y antitoxina diftérica (Figura 6,1).

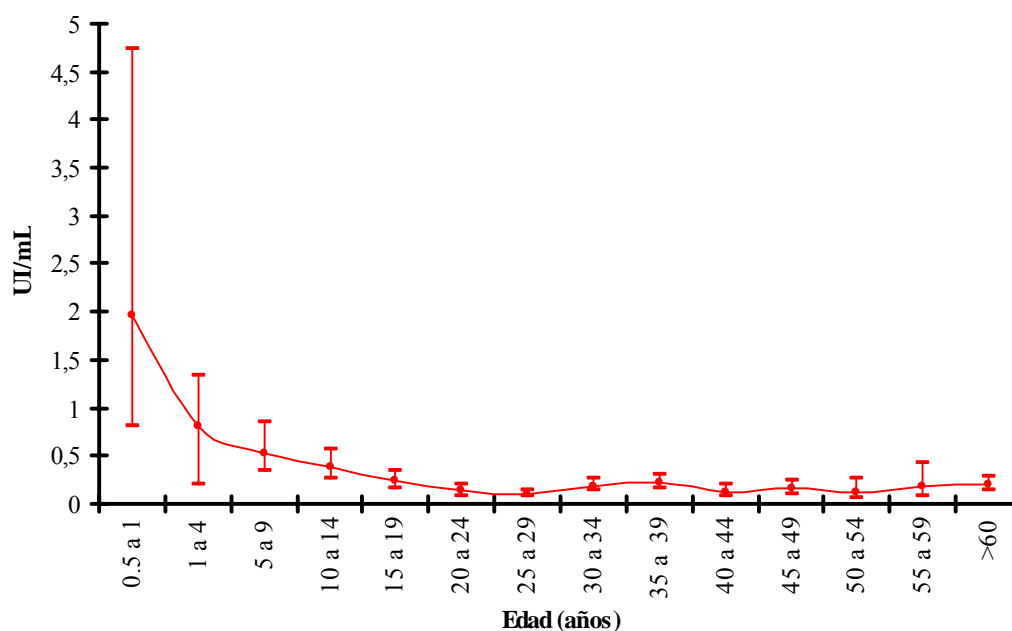


Figura 6,1. Antitoxina diftérica por grupos de edad en el municipio Alquízar, Cuba, 1999. Media geométrica e intervalos de confianza al 95%.

Se encontró un alto nivel de inmunidad contra la difteria en las primeras edades, atribuido a la alta cobertura de vacunación hasta los 5-6 años de edad, que sin embargo no cubre las edades superiores acorde con nuestro esquema nacional. Se detectó que el 29,05% de los

individuos mayores de 20 años no estaban protegidos adecuadamente contra la difteria y solo el 4,53% poseían una protección de larga duración.

En contraste, la protección contra el tétanos fue excelente, resultado coherente con el esquema de vacunación, que incluye refuerzos periódicos (Figura 6,2).

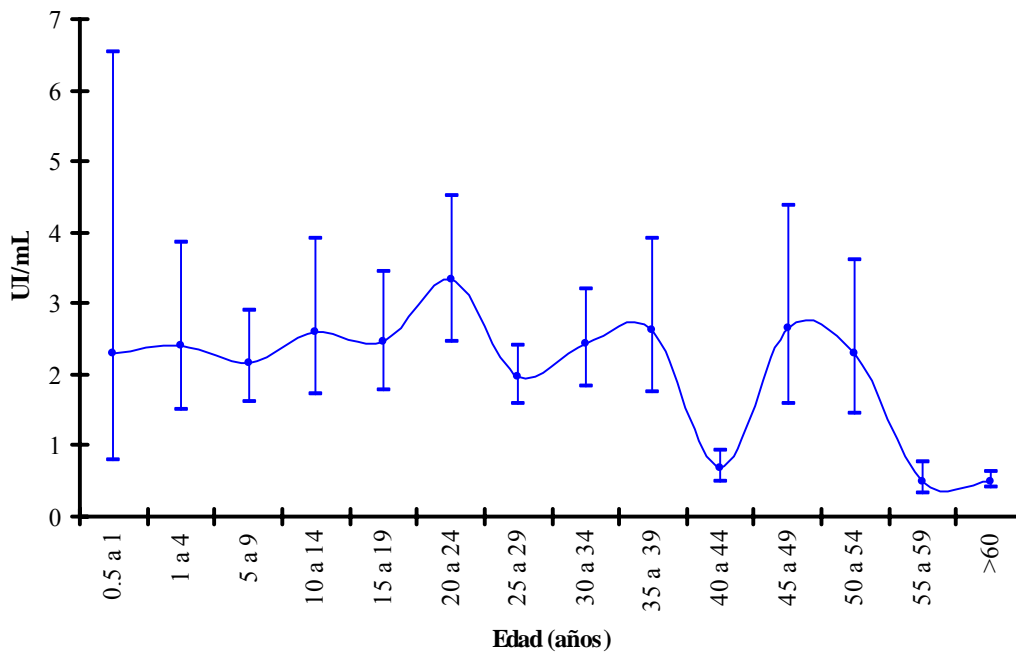


Figura 6,2. Antitoxina tetánica por grupos de edad en el municipio Alquízar, Cuba, 1999. Media geométrica e intervalos de confianza al 95%.

Durante el año 2002 se evaluó una muestra de recién nacidos en La Habana. Se encontró una inmunidad confiable antidiftérica tan solo en el 48,88% de los neonatos estudiados, de estos, únicamente el 1,29% con respuesta de larga duración. La escasa inmunidad antidiftérica en los recién nacidos refleja las deficiencias en la transferencia de anticuerpos a través de la placenta, y por ende una insuficiente inmunidad en sus madres.

En el año 2001 se realizó un estudio en niños cubanos entre 1 y 5 años de edad, seleccionados de todas las provincias de Cuba (Ochoa et al, 2006a). Los menores valores de antitoxina, tanto para el tétanos como la difteria, se observaron antes del refuerzo con la vacuna bivalente difteria/tétanos, que se aplica en el primer grado escolar y que corresponde a los 5 o 6 años de edad, aunque la mayor parte de ellos se encontraban protegidos contra ambos enfermedades (Figura 6,3).

En el grupo que recibió el refuerzo, se detectó una excelente seroprotección para ambas enfermedades, el 100% contra el tétanos y el 97,62% contra la difteria, predominando los títulos correspondientes a una protección de larga duración.

Esta investigación demuestra que los niveles de antitoxina tetánica y diftérica en niños cubanos son adecuados, y avalan la estrategia de vacunación empleada en esta población, lo que difiere con los resultados observados en los adultos.

Otro estudio realizado en La Habana durante los años 2005 y 2006 (Ochoa et al, 2006b), detectó que el 38,66% de los adolescentes entre 13 y 16 años estudiados tenían niveles de antitoxina diftérica inferiores a 0,1 UI/mL.

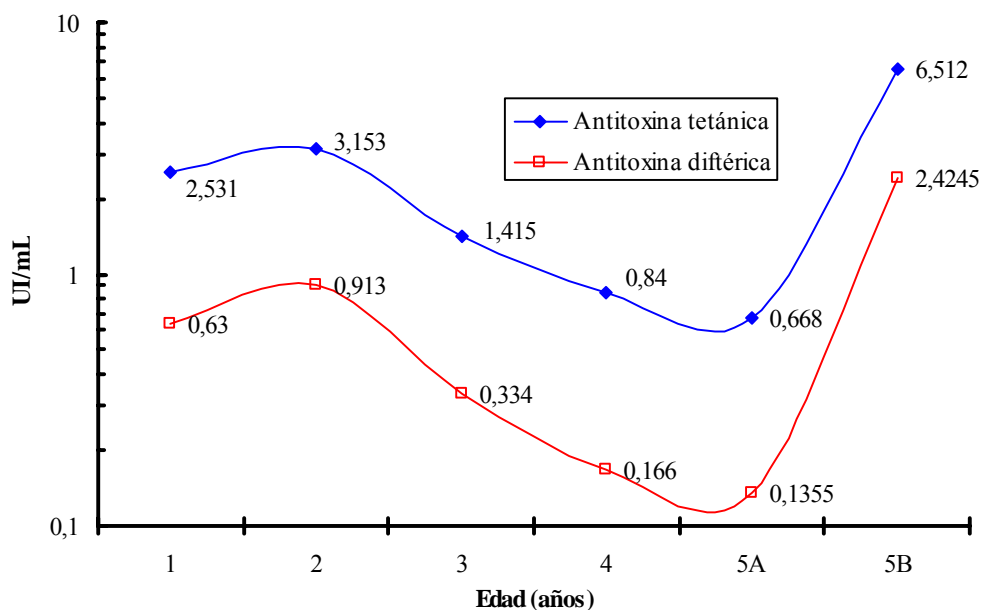


Figura 6,3. Antitoxina tetánica y antitoxina diftérica por grupos de edad en niños cubanos, 2001. Media geométrica. A=antes del refuerzo con la vacuna bivalente DT. B=después del refuerzo.

Podemos concluir acerca de estos estudios, que las condiciones que pueden propiciar la aparición de la difteria como una enfermedad reemergente, justifica la modificación de la política inmunitaria cubana, mediante la sustitución de los refuerzos con toxoide tetánico a partir de la adolescencia, por la bivalente para adultos de toxoide tetánico y diftérico en el Esquema Oficial de Vacunación de la República de Cuba.

En los últimos años se han reportado casos de tos ferina en la población adulta de varios países, por lo que se sugiere agregar componentes de *Bordetella pertussis* a la vacuna bivalente, para evitar la reemergencia de dicha enfermedad.

Inmunoepidemiología y predicción de la inmunidad

La inmunoepidemiología no solo es importante en el diagnóstico puntual de la inmunidad poblacional, sino en la predicción del comportamiento longitudinal de la inmunidad luego de la exposición inmunogénica.

Para una estimación aproximada de la inmunidad poblacional es necesario tener en cuenta las características del inmunógeno vacunal, la vertiente del sistema inmune preferentemente estimulada, la timodependencia o no de la respuesta inducida e incluso la clase y subclase de inmunoglobulinas que se producen. Las condiciones medioambientales, fundamentalmente las inherentes al hospedero y la influencia del resto de sus componentes sobre el mismo, deben también ser valorados a profundidad.

El empleo de modelos matemáticos es esencial para este fin; sin embargo, resulta muy difícil su diseño, teniendo en cuenta el carácter no-lineal de la respuesta inmune, basada precisamente en la individualidad que la caracteriza y las particularidades del entorno que inciden activamente sobre este sistema. Se requieren, por tanto, cálculos complejos, no necesariamente representativos de toda la población de un país, región o área geográfica determinada, lo que constituye una limitante.

La definición de estos modelos constituye un reto necesario, ya que nos permitiría evaluar con gran antelación los riesgos de enfermedad y decidir las adecuadas medidas de intervención, incluyendo la inmunización profiláctica, lo que sería muy útil en la organización de los servicios de salud. Pudieran también establecerse para pronosticar la evolución de la infección bajo la influencia de la respuesta inmune en el caso de vacunas terapéuticas.

La inmunización materna y la predicción del paso transplacentario de anticuerpos son también necesarias para el control de las enfermedades inmunoprevenibles durante los primeros meses de vida, en los que el sistema inmune no ha madurado completamente. La placenta humana regula la transferencia de anticuerpos de la madre al feto, la que es fundamentalmente mediada por transporte activo, en el que el receptor Fc- γ neonatal, identificado y caracterizado en células trofoblásticas humanas, desempeña un papel esencial.

La magnitud de transferencia de anticuerpos reportada es variable y depende, entre otros aspectos, del estado inmune de la madre, relacionado a su vez con diferentes elementos medioambientales, así como del nivel de desarrollo fetal. Se ha demostrado que existe correlación entre la transferencia de IgG y la edad gestacional. La mayor concentración de anticuerpos maternos se adquiere durante el tercer trimestre del embarazo, por lo que en los partos pretérminos se alcanzan bajos niveles de IgG en el recién nacido, lo que contribuye a su vulnerabilidad a las infecciones. También se ha observado que las deficiencias nutricionales en las embarazadas pueden provocar una inmunodeficiencia secundaria, factor de riesgo que incrementa también las posibilidades de infección en el recién nacido.

Por todo ello, resulta particularmente complejo el desarrollo de modelos matemáticos para pronosticar a priori con exactitud los niveles de IgG presentes en el neonato, aunque es generalmente aceptado que hay una relación directamente proporcional entre los niveles de anticuerpos de la madre y los del recién nacido, en lo cual se ha basado el control del tétanos neonatal.

En un estudio realizado durante el año 2004 en La Habana, se observó que la mayor parte de los recién nacidos presentaron valores superiores de antitoxina tetánica y antitoxina diftérica que sus madres, lo que habla a favor de la eficiencia de la transferencia transplacentaria de anticuerpos, aunque su magnitud depende de los niveles de anticuerpos maternos (Ochoa et al, 2007).

Los elevados niveles de antitoxina tetánica se relacionaron con el refuerzo de toxoide tetánico en las embarazadas, gracias a lo cual todos los recién nacidos estaban protegidos contra el tétanos, la mayor parte con valores correspondientes a una protección de larga duración (Tabla 6,1).

Tabla 6,1. Antitoxina tetánica en la pareja madre/recién nacido.

UI/mL	Madres		Recién nacidos	
	n	%	n	%
<0,1	0	0	0	0
≥0,1	96	100	96	100
>1	85	88,54	89	92,71
MG	3,260		4,688	
IC 95%	2,705 – 3,928		3,873 – 5,674	

UI/mL = Unidades internacionales por mililitro.

MG = Media geométrica.

IC 95% = Intervalo de confianza al 95%.

Los niveles de antitoxina diftérica fueron inferiores, aunque proporcionales (Tabla 6,2). El 54,17% de las madres y el 45,83% de los niños no se encontraban adecuadamente protegidos contra la difteria, de ahí la necesidad de incluir refuerzos con toxoide diftérico en las embarazadas.

Tabla 6,2. Antitoxina diftérica en la pareja madre/recién nacido.

UI/mL	Madres		Recién nacidos	
	n	%	n	%
<0,1	52	54,17	54	45,83
≥0,1	44	45,83	52	54,17
>1	0	0	1	1,04
MG	0,085		0,102	
IC 95%	0,069 – 0,106		0,082 – 0,126	

UI/mL = Unidades internacionales por mililitro.

MG = Media geométrica.

IC 95% = Intervalo de confianza al 95%.

Es necesario recalcar que la inmunización materna como estrategia de intervención puede extenderse hacia otras enfermedades. Actualmente limitada al tétanos, la difteria y la gripe, a los que se deben añadir vacunas contra: *Bordetella pertussis*, estreptococos del grupo β , virus sincitial respiratorio, neumococos y parainfluenza.

Inmunoepidemiología y ensayos clínicos de vacunas

La inmunoepidemiología es necesaria para caracterizar la población blanco del candidato vacunal, de extrema importancia tanto para el desarrollo farmacológico como para la estimación preliminar de esquemas, así como para una evaluación más objetiva del tamaño muestral y la evaluación de los resultados obtenidos en los ensayos clínicos. Por otra parte, está íntimamente relacionada con los controles que deben establecerse una vez aprobada una vacuna para su comercialización, lo que se ha dado en llamar estudios de poslicenciamiento o poscomercialización (fase IV), que incluyen la evaluación de la seguridad, la efectividad y la respuesta inmune inducida por la vacuna en la práctica médica.

Los estudios inmunoepidemiológicos pueden modificar el plan de desarrollo clínico de una vacuna, especialmente cuando el plan está escalonado por edad o indicación médica. También, pueden sugerir el desarrollo de un nuevo candidato vacunal.

Conclusión

La inmunoepidemiología nos aporta una información vital para la vacunología. No pueden desarrollarse vacunas sin definir el inmunógeno apropiado, la respuesta inmune necesaria acorde con la infectividad del microorganismo y sin conocer el estado inmune de una población dada. Es necesaria para definir estrategias de vacunación, para su evaluación periódica, así como la detección de grupos susceptibles. Constituye, además, una herramienta de medición en los ensayos clínicos de vacunas.

Los estudios inmunoepidemiológicos requieren de ELISAs adecuados para explorar la inmunidad poblacional. Estos deben ser cuantitativos y caracterizarse por su elevada precisión y reproducibilidad, requisitos indispensables, sobre todo en estudios longitudinales. Además, deben ser capaces de estimar la protección existente contra un agente biológico, atendiendo a la imposibilidad de parear las muestras en la mayor parte de esas investigaciones.

Bibliografía

1. Chen RT, Hardy IRB, Rhodes PH, Tyshchenko DK, Moiseeva AV, Marievsky VF. Ukraine, 1992: First assessment of Diphtheria vaccine effectiveness during the recent resurgence of Diphtheria in the former Soviet Union. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 1:178-83.
2. Galazka AM, Robertson SE. Immunization against diphtheria with special emphasis on immunization of adults. *Vaccine* 1996;14:845-57.
3. Greenwood B. Maternal immunisation in developing countries. *Vaccine* 2003;21:3436-41.
4. Hellriegel B. Immunoepidemiology - bridging the gap between immunology and epidemiology. *Trends Parasitol* 2001;17:102-6.

5. Malek A. Ex vivo human placenta models: transport of immunoglobulin G and its subclasses. *Vaccine* 2003;21:3362-4.
6. Maple PA, Jones CS, Wall EC, Vyseb A, Edmunds WJ, Andrews NJ, et al. Immunity to diphtheria and tetanus in England and Wales. *Vaccine* 2000;19:167-73.
7. Ministerio de Salud Pública de Cuba. *Anuario Estadístico de Salud 2012*. La Habana: MINSAP; 2012.
8. Ochoa R. La inmunoepidemiología. Objeto de estudio. Capítulo 1. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.1-4.
9. Ochoa R. Importancia de la inmunoepidemiología en la vacunología. Capítulo 6. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.49-57.
10. Ochoa RF, Acosta J, Ferriol XR, Ginebra M. Evaluación de anticuerpos contra enfermedades prevenibles por vacunas en el binomio madre-recién nacido en hospitales de Ciudad de La Habana. *VacciMonitor* 2007;16(2):16-20.
11. Ochoa RF, Martínez JC, Ferriol XR, Sotolongo FT. Niveles de antitoxina tetánica y diftérica en recién nacidos y niños preescolares cubanos. *Revista Cubana Med Trop* 2006a;58(1):44-9.
12. Ochoa RF, Baró IM, Menéndez J, Triana T, Mirabal M, Armesto M, et al. Reactogenicidad e inmunogenicidad de una nueva vacuna de toxoide tetánico y diftérico con concentración reducida en adolescentes cubanos. *VacciMonitor* 2006b;15(2):13-17.
13. Ochoa R. *Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos*. (Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias Médicas). Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana; 2002.
14. Peña GL. *Seroprevalencia de antitoxina diftérica y tetánica en la población de Alquizar*. (Tesis para optar por el título de Especialista de I Grado en MGI). Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana; 1999.
15. Vandelaer J, Birmingham M, Gasse F, Kurian M, Shaw C, Garnier S. Tetanus in developing countries: an update on the maternal and neonatal tetanus elimination initiative. *Vaccine* 2003;21:3442-5.

Epílogo

Los ensayos clínicos de vacunas necesitan de técnicas in vitro para evaluar la inmunogenicidad del candidato vacunal y de sus controles, así como estimar su eficacia serológica. Los estudios inmunoepidemiológicos requieren también de métodos apropiados para estudiar la inmunidad poblacional.

Por otra parte, el diagnóstico etiológico complementa estas investigaciones. Tomemos como ejemplo los estudios de eficacia evaluados mediante la ocurrencia de casos de la enfermedad de interés u otra condición asociada al agente causal, como el estado de portador o infección subclínica.

Entre todas las técnicas empleadas, el ELISA es aún una pieza clave para evaluar la inmunidad poblacional, la respuesta inmune inducida por vacunas, o con fines diagnósticos. El desarrollo de esta técnica es imprescindible si se quiere contar con instrumentos adecuados y que garanticen la reproducibilidad de los resultados. Para ello se requiere de una adecuada estandarización y validación.

Si se logra un ensayo cuantitativo, con correlatos de protección, el ELISA por sus ventajas, resulta una técnica insustituible para evaluar la inmunogenicidad de vacunas y su aplicación en estudios inmunoepidemiológicos.

Anexo 1

Glosario

Adyuvante: Compuesto capaz de potenciar una respuesta inmunitaria.

Aleatorización: Utilizar un método disciplinado de sorteo o azar para asignar el producto en investigación o su control a los sujetos incluidos en un ensayo clínico, de modo que cada sujeto tenga exactamente las mismas probabilidades de formar parte de uno u otro grupo de tratamiento.

Memoria inmunológica: Una respuesta cualitativamente superior ante la segunda administración de un inmunógeno dado.

Anticuerpo: Glicoproteína producida como resultado de la introducción de algún inmunógeno y que tiene la capacidad para combinarse con el que estimuló su producción.

Antígeno: Sustancia que se combina con los efectores de la respuesta inmune.

Células presentadoras de antígenos: Células que cooperan con los linfocitos en la formación de anticuerpos y de otras reacciones inmunitarias. Entre ellas se destacan las células dendríticas y los macrófagos.

Células naturales asesinas (NK en Inglés): Células que producen citotoxicidad celular sin sensibilización previa.

Células B (Linfocitos B): Células derivadas de la Bursa de Fabricio en las aves y, por analogía, células equivalentes a las derivadas de la médula ósea en el hombre. Estas células son precursoras de las células plasmáticas.

Células plasmáticas: Células sintetizadoras de anticuerpos totalmente diferenciadas que provienen de los linfocitos B.

Células T (linfocitos T): Células derivadas del timo que participan en diversas reacciones inmunitarias.

Células T auxiliares o cooperadoras (Helper en inglés): Subtipo de linfocitos T que cooperan con las células B en la formación de anticuerpos y participan en otras reacciones inmunitarias.

Citocinas: Moléculas producidas por diversos tipos celulares, que actúan sobre ellas mismas y otras células.

Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC en inglés): Forma de citotoxicidad en la cual algunas células efectoras destruyen células blanco recubiertas de anticuerpos.

Clase de inmunoglobulina: Subdivisión de las moléculas de inmunoglobulinas, basada en los determinantes antigénicos de la región Fc de las cadenas pesadas. En el hombre hay 5 clases, designadas como: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

Complemento: Sistema de proteínas séricas que es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo.

Correlato de protección: Término utilizado para consignar que existe un título de anticuerpos definido, que se corresponde con la protección clínica de una vacuna. No todas las vacunas lo tienen descrito.

Desarrollo clínico de un producto: Es un proceso escalonado y sucesivo que implica un conjunto de estudios, tareas y decisiones, que debe tener una sólida base científica, necesario para obtener información de seguridad y eficacia de un nuevo producto en humanos, el cual es imprescindible para solicitar su registro y futura comercialización.

Detectabilidad: También conocido como límite de detección. Es la menor cantidad de analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas. La concentración mínima de una sustancia que genera una respuesta consistentemente mayor que el fondo del ensayo.

Efectividad vacunal: Grado en que una intervención, en este caso una vacuna, origina un resultado beneficioso en la práctica habitual. En vacunación es también el efecto protector directo debido a la aplicación de la vacuna más el efecto indirecto aportado por la inmunidad poblacional o colectiva.

Eficacia: Es la capacidad general de un inmunoensayo para detectar correctamente todos los positivos y los negativos.

Eficacia vacunal: Grado en que una intervención, en este caso una vacuna, origina un resultado beneficioso (protección contra una infección determinada) en un ensayo clínico que se realiza en condiciones ideales de investigación.

ELISA: Del inglés “Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay”, ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida.

Enfermedad autoinmune: Manifestación clínico patológica causada por reacciones autoinmunes, no fisiológicas, que causan daño a células, tejidos u órganos del propio individuo. Se produce al perderse la autotolerancia.

Enfermedad reemergente: Son aquellas que en su momento dejaron de ser un problema de salud producto de los progresos en su control y prevención, y que al romperse el equilibrio entre el agente causal y estas medidas, debido a: pérdida de inmunidad, resistencia antibiótica, detrimento de los sistemas de salud o al cambio climático, surgen nueva y habitualmente de forma más severa o con características cualitativas diferentes.

Especificidad: Proporción de muestras negativas (no reactivas) correctamente identificadas.

Estudio de no-inferioridad: Ensayo encaminado a demostrar que una intervención (medicamento o vacuna) no es inferior o peor que otro que posee una eficacia demostrada.

Estudio de superioridad: Ensayo diseñado para demostrar que una intervención (medicamento o vacuna) es superior o mejor que otro que posee una eficacia demostrada.

Estudio reto: Ensayo especial que debe realizarse en condiciones muy bien controladas, ya que implica exponer al voluntario a un microorganismo o sustancia tóxica para lo cual puede o no estar protegido. En vacunas permite caracterizar la eficacia o la capacidad protectora del producto en investigación.

Evento adverso: Cualquier acontecimiento médico desfavorable que se presenta en un paciente o sujeto de investigación clínica al que se administra un producto farmacéutico, y que no tiene necesariamente una relación causal con este tratamiento. Un acontecimiento o

evento adverso puede ser, por tanto, cualquier síntoma o signo desfavorable (incluyendo un hallazgo de laboratorio anormal), o enfermedad temporalmente asociada con el uso de un producto en investigación, esté o no relacionado con este producto.

Exactitud: Es el grado de identidad de los valores analíticos obtenidos con cierto método y el contenido real del analito en la muestra.

Fagocitosis: Ingestión de microorganismos o de otras partículas por los fagocitos.

Grupo Control: En un ensayo clínico es el grupo que sirve como patrón de comparación porque no ha recibido la intervención o el tratamiento de interés. Si recibe un tratamiento similar, ya conocido y aceptado, se le denomina control activo.

IgA: Clase de inmunoglobulina que predomina en las secreciones.

IgG: Clase de inmunoglobulina predominante en el suero humano.

IgM: Inmunoglobulina pentamérica de elevado peso molecular.

Incidencia: Número de casos nuevos de una enfermedad determinada (o de un efecto adverso o de una complicación, etc.) que se desarrollan en una población de riesgo durante un período de tiempo.

Inmunidad mediada por células: Aquella en la que la participación de linfocitos T y macrófagos es predominante.

Inmunodeficiencias: Grupo heterogéneo de enfermedades, congénitas o adquiridas, en las que algún componente de los mecanismos de defensa del hospedero está ausente o es funcionalmente defectuoso.

Inmunoepidemiología: Es la disciplina integradora orientada a la vigilancia de las enfermedades e investiga la influencia de la inmunidad poblacional sobre diferentes patrones epidemiológicos.

Inmunógeno: Sustancia que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria, en contraste con aquellas que sólo se combinan con los efectores (antígeno).

Inmunógeno timodependiente: Inmunógeno que para generar anticuerpos necesita la cooperación de los linfocitos T.

Inmunogenicidad: Capacidad de un inmunógeno (vacunal o no) para inducir una respuesta inmune.

Inmunoglobulina: Glicoproteína compuesta de cadenas pesadas y ligeras. Todos los anticuerpos son inmunoglobulinas.

Límite de cuantificación: Es la mínima concentración del analito que puede determinarse con una precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones experimentales establecidas.

Linealidad: Es la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado.

Linfocito: Célula mononuclear, de núcleo con cromatina densamente empaquetada y un pequeño borde de citoplasma.

Linfocitos activados: Aquellos que han sido estimulados por algún inmunógeno.

Macrófagos: Fagocitos mononucleares que derivan de los monocitos y desempeñan papeles accesorios en la inmunidad.

Opsonina: Sustancia capaz de intensificar la fagocitosis. Los anticuerpos y derivados del complemento son las principales.

Precisión: Se define como la dispersión de los datos obtenidos para una muestra procesada varias veces y se expresa como el coeficiente de variación.

Rango: Es el intervalo entre el mayor y el menor nivel de analito que pueden ser medidos con aceptable precisión y exactitud.

Reacción adversa: Un evento adverso que se considere causalmente relacionado con el, o los productos de investigación. Esta definición incluye las lesiones causadas por sobredosificación e interacciones con otros medicamentos.

Reactogenicidad: Incidencia y características de los eventos adversos locales o sistémicos que han ocurrido en relación con la administración de una vacuna.

Relación costo/beneficio: Expresión resultante de la consideración combinada de los beneficios y las pérdidas económicas asociados a una intervención médica.

Robustez: Investiga la influencia de pequeños cambios en las condiciones analíticas sobre la fiabilidad del método analítico, localizando los factores que originan fluctuaciones y los que necesitan una atención especial, en tanto originan variaciones significativas.

Selectividad: Se define como la capacidad del método para determinar el analito para el cual está diseñado, exactamente y sin que interfieran otros componentes de la muestra.

Sensibilidad: Es definida como la proporción de muestras positivas o reactivas correctamente identificadas por la prueba empleada.

Seroconversión: Aumento significativo de los títulos de anticuerpos inducidos por una vacuna con respecto a los detectados antes de la inmunización y que ofrece información sobre la inmunogenicidad de una vacuna.

Seroprotección: Título de anticuerpos que se supone corresponde a la protección clínica. No todas las vacunas lo tienen.

Subclase de inmunoglobulinas: Subdivisión de las clases de inmunoglobulinas, basadas en las diferencias estructurales y antigénicas en las cadenas pesadas.

Tolerancia (fortaleza): Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones de operación.

Vacuna: Preparado biológico que se inocula en un organismo con el fin de lograr un estado de inmunidad contra un determinado agente infeccioso o una enfermedad dada.

Vacuna combinada: Contiene inmunógenos de varios agentes infecciosos diferentes (por ejemplo, la triple viral: sarampión-rubéola-parotiditis), que se aplican en una sola administración. No debe confundirse con vacunaciones simultáneas.

Vacuna conjugada: Vacuna de polisacáridos al que se une (conjugada) un derivado proteico con objeto de aumentar su inmunogenicidad, de esta forma pasa de ser timoindependiente a timodependiente, lo que permite que desencadene una respuesta inmune secundaria y de memoria adecuada, incluso en lactantes pequeños.

Vacuna recombinante: Vacuna de inmunógeno proteico obtenido mediante la inserción (recombinación genética) en un microorganismo (por ejemplo, una levadura) o en un cultivo

celular, de un fragmento apropiado, habitualmente un plásmido bacteriano, que contiene el gen o segmento de ADN que codifica el inmunógeno deseado.

Validación: Es el proceso establecido para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos.

Valor Predictivo Positivo: Es la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente positivo, cuando el resultado de la prueba que se le practica resulta reactivo.

Valor Predictivo Negativo: Es la probabilidad que tiene un individuo de ser negativo, cuando el resultado de la prueba es no reactivo.

Anexo 2

Otros inmunoensayos en vacunología clínica

Inmunoensayos in vivo

Estos bioensayos miden la respuesta de anticuerpos usando un modelo animal.

Los ensayos de neutralización se basan en la propiedad neutralizante de los anticuerpos séricos sobre dosis conocidas de antígeno, como es el caso de la toxina tetánica, la cual al quedar libre se detecta en animales de laboratorio, generalmente ratones.

Estos métodos pueden dividirse en tres grupos. El primero se basa en la relación estrecha entre el tiempo promedio de supervivencia y la cantidad de toxina no neutralizada que todavía está presente en la mezcla suero-toxina. El tiempo exacto es medido durante el período de cinco días que sigue a la inyección de la mezcla de toxina y diferentes diluciones de suero. Estas técnicas requieren pocos materiales pero frecuentes observaciones.

El segundo grupo se basa en la proporción de ratones que mueren y sobreviven al final de un período determinado de tiempo después de inocular la mezcla suero-toxina. La principal desventaja es que se requiere un gran volumen de suero cuando la concentración de anticuerpos es baja.

El tercer grupo se basa en la discriminación entre la presencia de síntomas, por ejemplo, parálisis de la pata del ratón inyectado con la mezcla suero-toxina, y la neutralización completa de los síntomas. Este método requiere una menor cantidad de suero, pero es menos exacto y sensible.

La capacidad dermonecrótica de algunos antígenos, como la toxina diftérica, es decir, la capacidad de producir una reacción inflamatoria cuando se inyecta intradérmicamente en personas o animales, ha sido usada en ensayos de neutralización in vivo; en el primer caso tenemos la prueba de Schick, no usada hoy en día para estos fines, principalmente por motivos éticos. Estos ensayos se realizan en conejos o cobayos, inyectando diferentes diluciones del suero con cantidades fijas de toxina en la piel depilada de los animales. La concentración de antitoxina se estima según la ausencia o presencia de la reacción inflamatoria.

Los resultados de estas pruebas dependen de la avidéz del antisuero, la concentración de la toxina y las especies de animales usadas, lo que representa una desventaja adicional a las descritas.

La aplicación de los métodos in vivo en los ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos está limitada por las restricciones obvias para procesar un elevado número de muestras, por lo que en la práctica no se emplean; sin embargo, los ensayos in vivo al explorar la capacidad funcional de los anticuerpos, pueden utilizarse en estudios restringidos para apoyar resultados obtenidos con técnicas in vitro.

Ensayos in vitro funcionales

Prueba de neutralización en cultivo de tejidos. Se basa en la observación de que la supervivencia de células en cultivo se inhibe por la presencia de antígeno. Este efecto es neutralizado cuando el anticuerpo específico está presente en las muestras de suero analizadas. Se preparan diferentes diluciones de suero y se mezclan con el antígeno, se añaden las células y después de incubar, los resultados se manifiestan como un cambio de color debido a la formación metabólica de ácidos que modifican el pH.

Ensayo bactericida en suero. La determinación de la actividad bactericida involucra la exposición de un organismo viable a una concentración adecuada de anticuerpo y complemento, incubación a la temperatura óptima y determinación, después de un período apropiado de tiempo, de la cantidad de organismos vivos. Este ensayo ha sido considerado la “prueba de oro” para evaluar la inmunogenicidad de vacunas antimeningocócicas. Un incremento de los títulos después de la inmunización con vacunas de polisacáridos se correlaciona con la protección. Sin embargo, cuando se ha empleado para evaluar la eficacia de vacunas obtenidas a partir de vesículas de membrana externa del serogrupo B, los resultados obtenidos muestran una subestimación del grado de protección.

Otros ensayos funcionales. Aunque con menor frecuencia, por ser menos apropiados para estudios masivos, se han empleado otras técnicas, entre las que destacamos la opsonofagocitosis y la inhibición de la adherencia. El primero se basa en que la ingestión de bacterias y partículas requiere de un contacto íntimo entre estas y la membrana del granulocito neutrófilo, proceso favorecido por la acción de opsoninas séricas, o bien derivadas del sistema del complemento o inmunoglobulinas de la clase IgG. La opsonofagocitosis determina la presencia adecuada de opsoninas en el suero del individuo. Esta técnica es la indicada para evaluar vacunas contra *Streptococcus pneumoniae*.

La adherencia de los microorganismos es uno de los factores de virulencia más importante y un paso crítico en la colonización y posterior diseminación. Los mecanismos efectores de la inmunidad de mucosa, fundamentalmente IgA secretoria, están encaminados a impedir la adhesión del microorganismo a sus receptores celulares. La inhibición de la adherencia demuestra la existencia de un apropiado nivel de antiadhesinas.

Ensayos in vitro no funcionales

Reacciones de agregación. En estas reacciones, cuando todos los sitios de unión del antígeno y el anticuerpo están utilizados, se forma un retículo que puede exteriorizarse por la precipitación o aglutinación del inmunocomplejo.

Las reacciones de precipitación pueden realizarse en medio líquido o más frecuentemente en medio sólido. Entre estas últimas tenemos la doble inmunodifusión, la inmunodifusión radial simple y procedimientos electroforéticos como la inmunolectroforesis y la contraelectroforesis. Estos métodos tienen como principal desventaja su insuficiente sensibilidad.

En las técnicas de aglutinación pasiva se han empleado eritrocitos o partículas de látex u otro material, sensibilizadas con el antígeno y que aglutinan en presencia de anticuerpos específicos. Son pruebas rápidas y que requieren un equipamiento sencillo. La principal

desventaja radica en su preferencia hacia anticuerpos de clase IgM y en su baja correlación con los ensayos in vivo a pequeñas concentraciones de anticuerpos.

Radioinmunoanálisis (RIA). Esta técnica ha sido usada para la cuantificación de anticuerpos, generalmente empleando una fase sólida (radiometría) para fijar los antígenos de captura para los anticuerpos específicos, que a su vez son detectados por un conjugado anti-inmunoglobulina humana marcada con un isótopo radioactivo. Es alta la sensibilidad y detectabilidad en estos ensayos; sin embargo, sus reactivos y equipamiento son caros, la técnica requiere de personal altamente entrenado y el material radioactivo representa un riesgo potencial.

Inmunoensayos enzimáticos. El ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) resulta la técnica de elección entre los ensayos in vitro no funcionales, tal y como discutimos en el primer capítulo.

Métodos ex vivo

Son ensayos in vitro que simulan los procesos que ocurren in vivo. Un ejemplo de ello es el ensayo de sangre total, modelo de bacteriemia que evalúa las interacciones de la bacteria y el hospedero. La habilidad del microorganismo de sobrevivir en la sangre depende, entre otros factores, de los atributos patogénicos y del estado fisiológico de la célula bacteriana cuando penetra en el torrente sanguíneo.

En este estudio se realiza la unión de la sangre a evaluar con la bacteria cuando la célula se encuentra en su fase exponencial de crecimiento. Este modelo es una medida sensible de actividad bactericida, que integra la actividad opsonizante de los anticuerpos, de las opsoninas derivadas de la activación del sistema del complemento y la fagocitosis ulterior, además de la lisis mediada por anticuerpos y el complemento autólogo.

Se ha usado eficazmente para evaluar la respuesta antimeningocócica, siendo una herramienta más sensible que los clásicos ensayos bactericidas en suero. Como limitante podemos señalar su laboriosidad, su ejecución inmediata al muestreo y el poco número de muestras que pueden procesarse en cada jornada.

Valoración de la respuesta celular

La valoración directa del funcionalismo de la vertiente celular del sistema inmune es difícil, por lo que se han empleado técnicas indirectas tales como el ensayo ELISPOT que permite detectar células linfoides específicas a un antígeno dado, así como la evaluación de respuestas funcionales de células T activadas por antígenos, incluyendo la producción de citocinas.

Las técnicas para evaluar la inmunidad celular tienen como dificultad adicional la limitación al procesamiento de un número grande de muestras, como las que usualmente se procesan en estudios clínicos de vacunas e inmunoepidemiológicos.

Las pruebas in vivo cutáneas de hipersensibilidad retardada se han usado para evaluar la inmunidad mediada por células. Estos ensayos consisten en la inyección intradérmica de los antígenos a los cuales se desea evaluar la respuesta celular, teniendo por supuesto en cuenta

que procedan de microorganismos cuyos mecanismos de defensa principales sean celulares. Este fenómeno se apoya principalmente en el reclutamiento de macrófagos y polimorfonucleares por parte de las células T activadas por el antígeno.

Otras pruebas

Algunos estudios requieren la evaluación estructural y funcional del sistema inmunitario, incluyendo los mecanismos efectores de amplificación.

La determinación de los antígenos de histocompatibilidad predominante en una población, o en aquellos individuos con respuesta deficiente, puede ser un procedimiento de interés, avalado por el papel de estas moléculas en la presentación antigénica.

En diversos ensayos clínicos de vacunas, como los de eficacia, así como para valorar racionalmente la inmunidad en estudios poblacionales, debe establecerse el diagnóstico etiológico de la enfermedad infecciosa de interés, por métodos directos mediante la visualización, el aislamiento e identificación del agente o mediante la detección de sus antígenos, metabolitos u otros componentes estructurales.

Estos métodos pueden ser procedimientos microbiológicos convencionales, inmunológicos o técnicas modernas de biología molecular, especialmente útiles en la detección de agentes biológicos difícilmente cultivables, poco detectables por otros procedimientos, así como para una adecuada clasificación genotípica en aquellos casos que lo requieran.

La correcta detección de subtipos bacterianos es la base del control epidemiológico de brotes infecciosos. Los métodos de subtipaje pueden ser fenotípicos y genotípicos. La importancia de estos últimos está dada en que distinguen cepas de igual fenotipo sobre la base de diferencias en sus moléculas de ADN. Dentro de los métodos genotípicos, vitales para la epidemiología molecular y la inmunoepidemiología, se destacan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la secuenciación de ADN y la electroforesis en campo pulsante.

Para el diagnóstico, también pueden emplearse métodos indirectos, en los cuales se valora la respuesta inmune frente al microorganismo causal; bien por métodos serológicos que ponen de manifiesto los anticuerpos formados frente a los diferentes inmunógenos, como por pruebas para el estudio de la inmunidad celular, similares a las ya descritas. Cuando se usan métodos indirectos hay que distinguir entre la respuesta inmune inducida por la vacunación, por la exposición al agente infeccioso, o reactividad cruzada con otros microorganismos.

Las pruebas de embarazo para detectar gonadotropina coriónica humana, en orina o suero, son usadas en las primeras fases de los ensayos clínicos como criterio de exclusión si el resultado es positivo. Pueden ser cualitativas, basadas en técnicas inmunocromatográficas, o cuantitativas, más sensibles, por RIA o ELISA.

Una mención final a los biosensores, estos pudieran ser usados en la investigación clínica de vacunas, probablemente en estudios con un limitado número de muestras, una vez superadas sus limitaciones tecnológicas y de costo.

