

ELISA cualitativo de IgA anti-Lipopolisacárido de *Vibrio cholerae* en saliva de humanos

Judith Mónica del Campo, Rolando Ochoa, Miriam Lastre, Gustavo Bracho, Carlos Taboada, Miriam Díaz y Oliver Pérez

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: judithc@finlay.edu.cu

Se estandarizó un ELISA para detectar el principal antígeno inductor de protección de *Vibrio cholerae* en saliva IgA contra el lipopolisacárido (LPS). El estudio se llevó a cabo en voluntarios que fueron inoculados por vía oral con dosis de 0, 107, 108, 109 unidades formadoras de colonias (ufc) del candidato vacunal El Tor Ogawa, cepa 638. Las muestras de saliva fueron tomadas de forma seriada, a los 0, 7, 8, 9, 10 y 14 días postinoculación. Se consideró seroconversión si las densidades ópticas eran superiores al nivel de corte y si los incrementos después de inmunizar duplicaban los valores antes de la inmunización. Los resultados, al ser comparados con los grupos experimentales, condición individuos inoculados y los placebos, demostraron que la técnica tiene una sensibilidad del 93,3%, una especificidad del 96,0%, un valor predictivo positivo de 98,2% y negativo de 85,7%, y una eficiencia del 94,1%. Se demostró la presencia de IgA anti LPS en saliva de los individuos inoculados con el candidato vacunal, con una mayor concentración de anticuerpos con el inóculo de (109 ufc) y se obtuvo la máxima positividad a los nueve días.

Palabras claves: Cólera, saliva, mucosa, IgA, ELISA

Introducción

El cólera es una infección aguda del tracto gastrointestinal, causada por *Vibrio cholerae*, que se caracteriza, en los casos graves, por la aparición brusca de diarreas acuosas no sanguinolentas y abundantes, vómitos, deshidratación rápida (provocada por la pérdida de líquido) y el desequilibrio electrolítico consiguiente, acidosis metabólica, hipopotasemia y colapso hipovolémico con insuficiencia cardíaca. En los casos no tratados se produce la muerte dentro de las 24 h de su aparición (1, 2). La infección se disemina a través de la vía fecal-oral (3).

Los mecanismos inmunes relacionados con el cólera comprenden una inmunidad antitóxica y antibacteriana. Estas respuestas ocurren fundamentalmente a nivel de mucosa y son mediadas por anticuerpos de clase IgA que neutralizan la colonización intestinal, así como la unión de la subunidad B de la toxina colérica (CT) a su receptor específico (4,5). Se ha determinado que el lipopolisacárido (LPS) es el que induce mejor respuesta de anticuerpos y que estos se relacionan con la inducción de protección (6-9). Por ser *V. cholerae* un microorganismo no invasivo, que genera toda una respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal y que la propia enfermedad confiere una protección duradera, un preparado vacunal contra el cólera debe ser oral,

preferiblemente con una bacteria viva o que en el proceso de producción conserve en lo posible la estructura nativa (10,11). Recientemente, el Centro Nacional de Investigaciones Científicas y el Instituto Finlay obtuvieron un grupo de cepas atenuadas de *V. cholerae* delecionadas en el "cassette" de virulencia, entre ellas se encuentran cepas del biotipo El Tor serotipo Ogawa (12-14).

El Vibriocida Sérico y el ELISPOT en sangre periférica son las técnicas más aceptadas para correlacionar con la inducción de una buena inmunogenicidad y protección. El Vibriocida mide la respuesta de IgG e IgM sérica y no la IgA y el ELISPOT es una técnica costosa y mide IgA a nivel de sangre y no a nivel efector mucoso. Por ello, nos propusimos la estandarización de un ELISA cualitativo en Saliva para determinar la inducción de IgA anti LPS Ogawa de *V. cholerae* en voluntarios inoculados por vía oral y valorar la aparición de IgA específica a nivel efector, así como estudiar el efecto de la dosis y cinética en la respuesta inducida.

Materiales y Métodos

Universo: Doscientos ochenta voluntarios cubanos sanos entre 18 y 40 años de edad, sin antecedentes de vivir en zonas endémicas de cólera y no haber sido vacunados contra esta enfermedad, formaron parte de este estudio. Ciento diez sin inmunizar fueron empleados para

determinar el valor de corte del ELISA y el resto fueron incluidos en el ensayo clínico del candidato vacunal, teniendo en cuenta los requisitos de inclusión y exclusión establecidos en el Proyecto de Cólera del Instituto Finlay (14). Las dosis orales fueron de: 0, 107, 108 y 109 de *V. cholerae*. El Tor Ogawa, cepa 368 (12-14). Las muestras de saliva fueron tomadas de forma seriada, a los 0, 7, 8, 9, 10 y 14 días post-inoculación, recogién dose por estimulación masticatoria para garantizar que provenga de glándulas parótidas, donde se conoce que las concentraciones de IgA son mayores. Estas muestras fueron inactivadas a 56 °C por 15 min, centrifugadas a 9000 g y conservadas a -20 °C hasta su uso (15).

ELISA Indirecto de IgA en saliva. Para el recubrimiento se utilizó 100 µL por pozo de lipopolisacárido Ogawa (LPS) purificado en el Departamento de Bacterias Enteropatógenas del Instituto Finlay por el método de Westphal, 1965 (13) y este fue diluido en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF) 0,15 M, pH 7,2. Se incubó durante 16 h a 4 °C y se evaluaron concentraciones de recubrimiento desde 2,5 hasta 80 µg/mL de antígeno. Las placas fueron bloqueadas con leche descremada al 3% diluida en SSTF. Se aplicaron 100 µL de las muestras por duplicado, previamente diluidas (1:2 a 1:8) y se incubaron 0,5, 1 y 2 h a 37 °C. Se usaron dos controles: uno positivo construido a partir de un suero con alto título de IgA anti-LPS diluido entre 1:50 hasta 1:16000 y otro negativo de una muestra de saliva, sin IgA anti LPS diluido 1:2 a 1:8. Se utilizó un conjugado anti IgA humana peroxidasa (Sigma) y se incubó 0,5 y 1 h a 37 °C. Las diluciones de las muestras, los controles y el conjugado se realizaron en la solución de bloqueo con Tween 20 al 0,05%. Se añadió 100 µL/pozo de solución sustrato, usándose como cromógeno O-Phenylenediamine (Sigma), se incubaron las placas durante 30 min en cámara oscura a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 50 µL por pozo de HCl 2,5 N y se efectuó la lectura a 492 nm en un lector de microELISA (Titertek

Multiskan, Finland). Posterior a cada incubación se realizaron cuatro lavados sucesivos con SSTF 0,15 M, pH 7,2 con Tween 20 al 0,05%.

Criterios de aceptación de una placa. En cada placa se usaron 4 réplicas de la muestra control negativo y del control positivo. Se calcularon las absorbancias promedios, sus desviaciones estándares (DE) y los límites superior e inferior (promedio ± 2 DE) de las réplicas de los controles positivo y negativo con vistas a eliminar los valores extremos. Cada placa se aceptó cuando el promedio de las réplicas del control positivo fue mayor que el nivel de corte de cada placa y ninguna o sólo una de las réplicas del control negativo y del positivo fueran rechazadas.

Nivel de Corte. Se calculó el cociente entre la absorbancia de cada una de las 110 muestras de individuos sin inmunizar que no se incluyeron en el ensayo y el promedio de las réplicas del control negativo. Se seleccionó como nivel de corte el mayor valor normalizado encontrado.

Criterio de positividad. Se consideró una muestra positiva, si al menos en uno de los tiempos posteriores al inóculo, se cumplieron los dos criterios siguientes: un incremento ≥ 2 entre las absorbancias pre y post-inoculación y el valor de absorbancia post-inoculación fue mayor que el valor del nivel de corte de la placa.

Procedimiento estadístico: Se realizaron tablas de contingencias para calcular los parámetros de control para un inmunoensayo cualitativo: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) y la eficiencia del sistema comparando los resultados de la técnica de ELISA con los grupos experimentales, en los que se usó el candidato vacunal y el grupo placebo (16). Se usó la prueba X2 (α=0,05) para detectar la influencia de la dosis con la prevalencia de IgA específica.

INÓCULO ELISPOT

| ELISA | Positivos | Negativos | Total |
|-----------|-----------|-----------|---------------|
| Positivos | a | B | a + b |
| Negativos | c | D | c + d |
| Total | a + c | b + d | a + b + c + d |

Donde:

- a: Número de individuos considerados como positivos en el ELISA y grupo inmunizado (verdaderos positivos).
- b: Número de individuos considerados como positivos en el ELISA y grupo placebo (falsos positivos).

- c: Número de individuos con resultados negativos por el ELISA y grupo inmunizado (falsos negativos).
- d: Número de individuos considerados negativos por el ELISA y grupo placebo (verdaderos positivos).

Sensibilidad: Se definió como la proporción de muestras positivas identificadas correctamente por la prueba de referencia.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a+c} \times 100$$

Especificidad: Se definió como la proporción de muestras negativas identificadas correctamente por la prueba de referencia.

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{d+b} \times 100$$

Valor Predictivo Positivo (VPP): Es la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente positivo cuando el resultado de la prueba resulta positivo.

$$\text{VPP} = \frac{a}{a+b} \times 100$$

Valor Predictivo Negativo (VPN): Es la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente negativo cuando el resultado de la prueba resulta negativo.

$$\text{VPN} = \frac{d}{d+c} \times 100$$

Eficiencia: Es la capacidad de un sistema analítico para detectar correctamente la mayor cantidad de verdaderos positivos y verdaderos negativos.

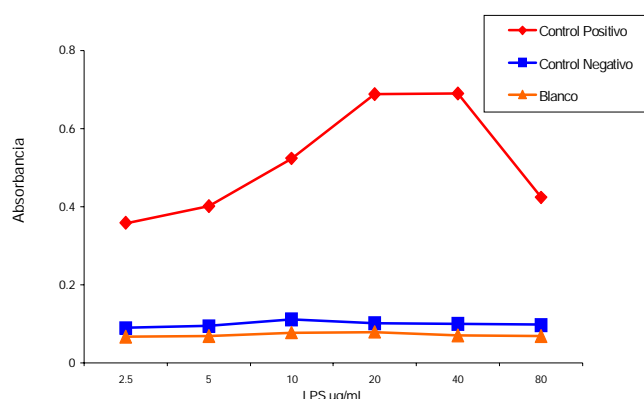
$$\text{Eficiencia} = \frac{a+d}{a+d+b+c} \times 100$$

Resultados y Discusión

La técnica del ELISA cualitativo es una alternativa útil cuando no se tiene un control estándar que permita el empleo de la cuantificación de las muestras, 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. En nuestro caso, trabajamos con muestras de saliva de sujetos inoculados con *V. cholerae* y no hemos encontrado un ensayo adecuado de referencia, la llamada prueba de "oro", para evaluar la equivalencia o no entre los ensayos (16).

Para determinar la concentración óptima de recubrimiento se ensayaron diferentes concentraciones de LPS Ogawa. A partir de 20 µg/mL no se incrementó la absorbancia del control positivo y se alcanzó la zona de meseta, que se extiende hasta 40 µg/mL, observándose un discreto efecto gancho en 80 µg/mL, concentración en la que la señal disminuye.

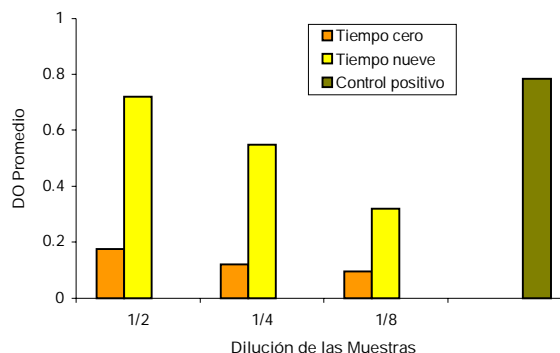
Figura 1. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento



Decidimos trabajar con una concentración de recubrimiento de 25 µg/mL para tomar un valor por encima del límite mínimo y alejado de los extremos de la zona de meseta (Figura 1).

Para determinar la dilución óptima de las muestras, se empleó saliva en diluciones sucesivas hasta 1/8. Se seleccionó como dilución óptima 1/2, donde se pudo comprobar la mayor discriminación pre y postinoculación (Figura 2).

Figura 2. Determinación de la dilución óptima de trabajo de las muestras de saliva

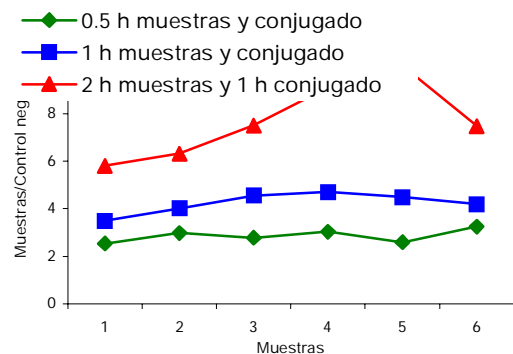


Como control positivo se empleó un suero con alto título de IgA anti LPS, por la necesidad de contar con suficiente volumen de muestra para su empleo en todos los ensayos y garantizar la reproducibilidad de los resultados en los diferentes ensayos clínicos prospectivos. Sus resultados sólo se usaron para la aceptación de las placas y no para determinar el valor de corte. Para garantizar que el comportamiento de este control fuera similar al de las muestras de saliva se probaron diferentes

diluciones. La dilución de trabajo seleccionada fue 1/400, densidad óptica (DO), similar al de las muestras de saliva positivas con títulos bajos.

La mejor combinación entre los tiempos de incubación de las muestras y el conjugado fue de 2 h para las primeras y 1 h para el segundo (Figura 3).

Figura 3. Determinación de los tiempos de incubación óptimos de las muestras y el conjugado



El valor de corte fue calculado con base a la normalización de las muestras negativas. Después de normalizadas cada una de las 110 muestras se seleccionó el mayor valor normalizado para un 100% de especificidad que fue 4,1.

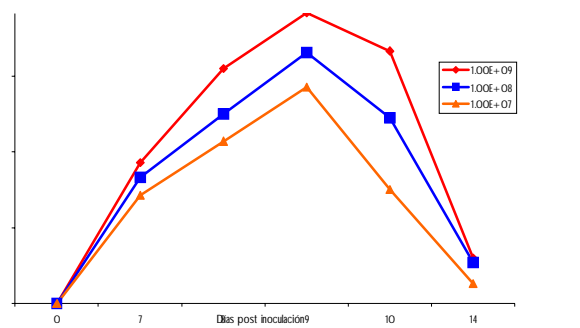
Con el nivel de corte seleccionado se determinaron los parámetros de control de las 170 muestras del ensayo clínico.

Se determinó la sensibilidad y especificidad clínica, así como el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo y la eficiencia del ensayo según los parámetros descritos en Materiales y Métodos en las muestras obtenidas a los nueve días de la inoculación, donde se obtuvo la máxima positividad del ELISA, se compararon los resultados con los individuos inoculados y los placebos. La sensibilidad y la especificidad fueron 93,3 y 96,0%, respectivamente. Estos resultados de sensibilidad y especificidad se encuentran dentro de los límites reportados. El valor predictivo positivo fue de 98,2%, es decir, la posibilidad de que las muestras positivas por ELISA sean verdaderas positivas es elevada. El valor predictivo negativo fue 85,7%. Por último la eficiencia del método 94,1% se encuentra dentro de los límites aceptables. Es necesario aclarar que todos los individuos vacunados no responden de la misma forma y podemos encontrar individuos inmunizados con el candidato vacunal con baja respuesta de anticuerpos (16-20).

Nuestro ensayo fue capaz de discriminar entre el grupo control (dosis 0) y los grupos con diferentes concentraciones de *V. cholerae* ($p < 0,05$).

Con vistas a valorar si la dosis influía en la presencia de IgA específica se agruparon los datos de acuerdo con el inóculo (0, 107, 108 y 109). Se observó la existencia de una respuesta dosis-dependiente donde al aumentar la concentración del inóculo aumentó la respuesta, siendo la de 109 la de mayor número de casos positivos detectados por ELISA ($p < 0,05$) (Figura 4).

Figura 4. Porcentaje de positividad según seriadamente de obtención de la saliva



El sistema inmune mucoso se encuentra integrado, por lo que las respuestas inducidas en las placas de Peyer, pueden ser evaluadas a distancia como, por ejemplo, en la saliva. Esta muestra es fácil de obtener y proviene, fundamentalmente de las parótidas, si el método de obtención es por masticación (15, 17). Además, para evitar la acción de las proteasas de esta secreción se puede trabajar inmediatamente a temperaturas bajas o realizar la inactivación de las mismas (18).

Los intentos de detección de IgA en saliva en vacunas de cólera no han tenido resultados totalmente satisfactorios, pues en algunos casos los tiempos de tomas de las muestras han sido muy espaciados (semanal) (19-21).

La aparición de IgA en saliva la detectamos a los siete días (primer día evaluado) después de administrar por vía oral el candidato vacunal, apreciando aumentos progresivos a los ocho y nueve días, declinando la respuesta a los 10 hasta desaparecer a los 14 días (Figura 4). Esto pudiera explicar la negatividad observada en ocasiones en otros ensayos (20-24).

Conociendo que existen mecanismos de recirculación linfocitaria y un sistema de mucosas común, estas células B IgA+ específicas pueden abandonar las placas de Peyer y ganglios linfáticos regionales, recirculando por la sangre periférica y colonizando la lámina propia y otros

sitios efectores. La marcada disminución a los 14 días pudiera estar ocasionada por la menor migración de linfocitos B a la mucosa bucal, con relación a los que se dirigen al intestino, donde se produjo la colonización o porque las células plasmáticas que arriben a la mucosa bucal comiencen a dejar de producir IgA, pues los plasmocitos son células terminales (25).

En resumen el ELISA desarrollado permitió la detección de la IgA anti-LPS en saliva en forma seriada y dosis dependiente. Resultados que pueden ser extrapolados a la evaluación de otras vacunas mucosales.

Referencias

1. Giono S, Gutiérrez L, and Hinojosa AM. *Manual de procedimientos para el aislamiento y caracterización de Vibrio cholerae O1*: En Publicación Técnica del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica No 10 México D. F; 1991.
2. Mims CA, Playfair J, and Roitt IM. *Microbiología Médica* In Mosby. 1995.
3. Instituto Pedro Kouri. Cólera: Incidencia/Cólera. Mortalidad/Estadística vital. *Boletín Epidemiológico*. 1995; 5:98.
4. Dunn-Walters D, Hackett M, Boursier L, Ciclitira PJ, Morgan P, Challacombe SJ, and Spencer J. Characteristics of Human IgA and IgM Genes Used by Plasma Cell in the Salivary Gland Resemble Those Used in Duodenum But Not Those Used in the Spleen. *J. Immunol*. 2000; 164:1595-1601.
5. Jonson G, Svennerholm AM, and Holmgren J. Expression of virulence factors by classical and El Tor *Vibrio cholerae* *in vivo* and *in vitro*. *Microbiology Ecology*. 1990; 74:221-223.
6. Apter FM, Plichetti P, and Winner LS. Analysis of the Roles of Anti Lipopolysaccharide and Anti-cholera Toxin Immunoglobulin A (IgA) Antibodies in Protection Against *Vibrio cholerae* and Cholera Toxin by use of Monoclonal IgA Antibodies *in vivo*. *Infect and Immun*. 1993;61:5279-5285.
7. Mackinnon LT, Ginn E, and Seymour GJ. Decreased salivary immunoglobulin A secretion rate after intense interval exercise in elite kayakers. *Eur. J. Appl. Physiol*. 1993; 67:180-184.
8. Winner L, Mack J, and Weltzin R. New model for analysis of mucosal immunity: Intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholerae* infection. *Infect. and Immun*. 1991;59:977-982.
9. Finlay B and Siebers A. Mechanisms of mucosal colonization and penetration by bacterial pathogens. En: J. A. Roth, editor. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 2nd ed, 1995:33-43.
10. Mortimer PP and Parry JV. Non-Invasive Virological Diagnosis: Are Saliva and Urine specimens adequate substitutes for Blood?. *Reviews Medical Virology*. 1991; 1:73-78.
11. Bloom PD and Bocdeker EC. Mucosal Immune Responses to Intestinal Bacterial Pathogens. *Seminars in Gastrointestinal Disease* 1996;7:151-166.
12. Benítez J, Silva A, Rodríguez BL, Fando R, Campos J, Robert A, *et al*. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: Construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains. *Arch. Med. Res*. 1996; 27:275-283.
13. Robert A, Silva A, Benítez J, Rodríguez BL, Fando R, and Campos J. Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin / protease gene using a novel reporter enzyme: Clostridium thermocellum endogluconase A. *Vaccine*. 1996; 14:1517-1522.
14. Benítez J, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B, *et al*. Preliminary Assessment of the Safety and Immunogenicity of a new CTX-negative, Hemagglutinin/Protease-Defective El Tor Candidate Cholera Vaccine Strain. *Infect. and Immun*. 1998; 66:539-545.
15. Czerkinsky C, Svennerholm A, Quiding M, Jonsson R, Holmgren J. Antibody-Producing Cells in Peripheral Blood and Salivary Glands after Cholera Vaccination of Humans. *Infect and Immun*. 1991; 59:996-1001.
16. Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García A, Ferriol X, Blanco R, and Sotolongo F. Validación de Inmunoensayos Cualitativos Usados para Evaluar la Inmunogenicidad de Vacunas. *VacciMonitor*. 2000;9:17-20.
17. Dunn-Walters D, Hackett M, Boursier L, Ciclitira PJ, Morgan P, Challacombe SJ, and Spencer J: Characteristics of Human IgA and IgM Genes Used by Plasma Cell in the Salivary Gland Resemble Those Used in Duodenum But Not Those Used in the Spleen. *J. Immunol*. 2000; 164:1595-1601.
18. Black RE, Levine MM, Clements ML, and Holmgren J. Protective efficacy in man of killed whole *Vibrio* oral cholera vaccine with and without the B subunit of Cholera Toxin. *Infect. and Immun*. 1987; 77:1116-1129.
19. Levine MM. Immunity to cholera as evaluated in volunteers. Eds. Cholera and related diarrheas, Basel. S. Karger 1980:195.
20. Jertborn M, Svennerholm AM, and Holmgren J. Gut Mucosal, and Serum Antitoxic and Antibacterial Antibody Responses in Swedes after Oral Immunization with B Subunit-Whole Cell Cholera Vaccine. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immun*. 1984;75:38-43.
21. Jertborn M, Svennerholm AM, and Holmgren J. Saliva, Breast Milk, and Serum Antibody Responses as Indirect Measures of Intestinal Immunity after Oral Cholera Vaccination or Natural Disease. *J. Clin. Microb*. 1986; 24:203-209.

22. Czerkinsky C, Quiding M, Eriksson K, and Holmgren J. Induction of Specific Immunity at Mucosal Surfaces: Prospects for vaccine development. *Advances in Mucosal Immunology*, Edited by J. Mestecky, et al., Plenum Press, New York: Plenum Press; 1995:1409-1415.
23. Viret JF, Favre D, Wegmuller B, Herzog J, Que JU, Cryz SJ, and Lang AB: Mucosal and Systemic Immune Response in Humans after Primary and Booster Immunizations with Orally Administered Invasive and Noninvasive Live Attenuated Bacteria: *Infect. and Immun.* 1999:3680-3685.
24. Bouvet J-P and Fischetti VA. Diversity of Antibody-Mediated Immunity at the Mucosal Barrier. *Infect. and Immun.* 1999; 67:2687-91.
25. Ogra PL, Mestecky J, and Lamm ME. *Handbook of Mucosal Immunology.* Academic Press Inc; 1994.

Qualitative ELISA for IgA anti-Lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* in Human Saliva

Abstract

An ELISA technique for IgA antibodies against *V. cholerae* lipopolysaccharide (LPS) in saliva was standardized. Humans volunteers were orally immunized with 0, 107, 108, 109 colony forming units of vaccine candidate 638, El Tor Ogawa. Saliva samples were collected 0, 7, 8, 9, 10 and 14 days after oral administration. A seroconversion was considered, if IgA titers determined by optical density, were higher than the cutoff value, and if increase after immunization duplicate the values before immunization. The technique showed a sensitivity of 93.3%, a specificity of 96.0% a positive predictive value of 98.2%, a negative predictive value of 85.7% and an efficiency of 94.1% when they were compared to the experimental group. The presence of specific IgA against LPS in saliva was demonstrated after immunization with the vaccine candidate. The results showed a kinetic profile with a maximum of IgA titer at day 9 post immunization with the highest frequency of positive titers found in the group immunized with 109 cfu.

Keywords: Cholera; saliva; mucose; IgA; ELISA