# Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG anti-polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C en sueros de ratones

**Maribel Cuello, Yanely Acosta , Juan C. Martínez, Osmir Cabrera**, **Rolando Ochoa, Julio A Balboa, Carmen R. Soto, Miguel E. Martínez, y Gustavo Sierra.**

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

E-mail: mcuello@finlay.edu.cu

Se desarrolló un ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA) indirecto para cuantificar anticuerpos IgG específicos antipolisacárido C en ratón, utilizando un prerrecubrimiento con Poli-L-lisina y luego el polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C (Instituto Finlay, La Habana, Cuba), para evaluar la respuesta inmune contra este componente en candidatos vacunales en estudios preclínicos. Como conjugado se utilizó anti-IgG ratón conjugado a fosfatasa alcalina, el cual se une a los anticuerpos antipolisacárido C producidos en ratones. La reacción es evidenciada por la degradación del sustrato p-nitrofenilfosfato. La detectibilidad del ensayo fue de 123,74 U/mL y la especificidad fue alta. La precisión interensayo, intraensayo y total, así como las desviaciones de la recuperación, linealidad y paralelismo no sobrepasaron el 10%. El ELISA permitió cuantificar los anticuerpos antipolisacárido C inducidos en ratones tanto por candidatos vacunales conjugados, como por la vacuna VA-MENGOC-BC® y el polisacárido C sin conjugar.

**Palabras claves**: ELISA, antipolisacárido C, *Neisseria meningitidis* serogrupo C, validación.

## Introducción

*Neisseria meningitidis* es una importante causa de infección del sistema nervioso central que origina una alta morbilidad y mortalidad, provocada fundamentalmente por cepas de los serogrupos A, B y C. Para prevenir esta enfermedad se han desarrollado vacunas antimeningocócicas polisacarídicas monovalentes, bivalentes y tetravalentes contra los serogrupos A, C, Y y W135. Estas vacunas han resultado ser inmunogénicas y tolerables en adultos, pero en niños menores de dos años confieren una inmunidad de corta duración (1). Un número importante de grupos e instituciones de investigación, incluido nuestro Instituto, se encuentran trabajando con la finalidad de obtener productos vacunales contra diferentes bacterias por medio de la unión covalente de polisacáridos capsulares o sus fragmentos a proteínas transportadoras que ofrezcan mayor protección en niños pequeños (2). Esta unión covalente se hace necesaria ya que los polisacáridos bacterianos presentan el problema de ser moléculas Timo Independientes (TI), lo cual trae como consecuencia que no sean inmunogénicas en niños pequeños, que son los más susceptibles a enfermarse con estos microorganismos (3).

Junto con las vacunas, surgen los métodos que permiten evaluar la respuesta inmune de estos preparados vacunales, entre ellos los inmunoensayos (4). Los inmunoensayos empleados en los estudios preclínicos y clínicos para la evaluación de la inmunogenicidad de vacunas, requieren una adecuada consistencia en sus resultados, de tal forma que pueda compararse la inmunogenicidad de las vacunas en diferentes estudios.

En este trabajo se describe la validación de un ELISA de tipo indirecto para la cuantificación de anticuerpos de ratón del isotipo IgG antipolisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C.

## Materiales y Métodos

**Preparación de la curva estándar:** Los sueros utilizados en este trabajo fueron obtenidos en ratones Balb/c procedentes del CENPALAB, La Habana, Cuba, en un rango de 18 a 20 g de peso corporal al inicio del experimento. Todos los animales estaban libres de patógeno.

La atención de los animales se realizó de acuerdo con las normas institucionales establecidas para el cuidado y uso de animales pequeños, según la Guía para el cuidado y empleo de los animales de laboratorio de la Comunidad Económica Europea (5). Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24 $^{o}$C), humedad (20-25%), ciclo alternativo de luz/oscuridad de 12 h, así como recibieron alimentación y agua acidulada con HCL a un pH de 2,5 a 2,8 *ad libitum.* A los animales

mantenidos bajo estas condiciones les fue administrado por vía Intraperitoneal tres dosis de 10 μg de polisacárido a los 0,14 y 28 días con una dosis refuerzo a los 42 días, de un conjugado obtenido en nuestro laboratorio a partir del polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C con VME de *Neisseria meningitidis* serogrupo B. Los animales fueron sangrados a los 57 días y una alícuota de los sueros obtenidos de los animales individuales fueron mezclados en un bulbo y almacenados a –20 °C . Este suero se comparó con un estándar similar de la Dirección de Asistencia Científico Técnica Aplicada (DACTA) que tenía 2000 U/mL asignadas.

**Suero Control**: El suero control positivo se preparó a partir de una mezcla de sueros con altos valores de Absorbancia. Se realizaron 46 determinaciones por ELISA de la concentración del suero control, diluido 1:100 en tampón solución salina tamponada con fosfato 0,15 M 7,2-7,4 (SSTF); 0,05% de Tween 20 y leche descremada al 3% (Merck) diluente de las muestras y conjugado (solución A), para una adecuada estimación del rango. Se desarrolló un análisis estadístico para comprobar la normalidad de las determinaciones del suero control y se determinó el Rango del Suero Control como la media ± 2 DE utilizando el paquete de programas Microsoft Excel 2000.

**Procedimiento del ELISA:** Se diseñó un sistema ELISA de tipo indirecto, en el cual se utilizaron placas de poliestireno de alta capacidad de acoplamiento (Costar, USA). Para el recubrimiento de la fase sólida se utilizó 100 μl por pocillo de Poli-L-Lisina (SIGMA, USA) a una concentración de 3 μg/mL en SSTF (6). La placa se incubó a temperatura ambiente por 30 min en cámara húmeda. Se realizaron tres lavados con SSTF a intervalos de 30 seg. Se adicionó 100 μl por pocillo de una solución de polisacárido C a una concentración de 2,5 μg/mL en SSTF (7). La placa se incubó de 16-20 h a 4 ºC en cámara húmeda. Se lavó tres veces a intervalos de 30 seg cada uno con SSTF; Tween 20, 0,05%. Se adicionaron las muestras en estudio, el estándar y el control del ensayo, diluidos 1:100 en el diluente de muestras y conjugado. Se colocó en incubadora (Sakura, Japón) a 37 ºC en cámara húmeda. Se realizaron tres lavados en condiciones idénticas al anterior. Se añadieron 100 μl por pocillo de un conjugado anti-IgG de ratón/ fosfatasa alcalina (SIGMA, USA), diluido 1/2000 en el diluente de muestras y conjugado. La reacción se realizó en incubadora (Sakura, Japon) durante 1 h a 37 ºC en cámara húmeda. Finalmente se realizaron tres lavados y se añadió el sustrato p- Nitrofenilfosfato (SIGMA, USA) en tabletas disueltas en solución reguladora de Dietanolamina 0,9 M pH 9,8, a una concentración final de 1 mg/mL. Se incubó durante 30 minutos en la oscuridad y se realizó la lectura a 405 nm en un lector de ELISA (Titertek Multiskan, Finlandia). La cuantificación se realizó mediante un programa aportado por el Centro para el control de enfermedades de Atlanta, USA, que utiliza una transformación logistic-log con cuatro parámetros (7).

**Parámetros de calidad del ensayo:** Para evaluar las características del sistema, se analizaron los parámetros siguientes:

**Concentración mínima detectable:** Se realizaron 80 repeticiones de un suero negativo contra el polisacárido C diluido 1:100 en el tampón diluente de las muestras. Se realizó el cálculo a través de la fórmula: Detectabilidad = Media del Control Negativo +2 desviación estándar (DE) (8).

**Precisión del sistema:** Se evaluó la precisión intraensayo del ELISA a través del análisis en tres días diferentes de cinco sueros murinos de diferentes concentraciones previamente determinadas, con 10 réplicas de cada muestra en cada ensayo, diluidas 1:100 en el diluente de muestras para el ELISA. La variación interensayo utilizó la información de una placa diaria durante tres días[8]. Además para la variación total se emplearon todos los valores. El Coeficiente de variación (CV) se utilizó para estimar la variación estadística entre las réplicas (6,9). Se consideraron óptimos los CV menores del 10% y aceptables entre 10-20% (8).

**Exactitud:** Para evaluar el recobrado del ensayo se utilizaron cinco muestras cuyas concentraciones coincidían con los diferentes segmentos de la curva estándar (valor teórico) y estas se mezclaron en partes iguales con un suero libre de anticuerpos contra el polisacárido de *Neisseria meningitidis* capsular C (valor medido). Se determinó el recobrado como: (media del valor medido/valor teórico de concentración) x 100. Se consideraron adecuados los recobrados entre 90 y 110% (8).

**Especificidad:** Se evaluó una mezcla de sueros negativos al polisacárido C obtenido en ratones de la línea Balb/C inoculados con vesículas de membrana externa (VME) de *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

**Evaluación de la curva estándar**

**Linealidad**: Se comprobó la linealidad de la técnica a través de la cuantificación de cinco pares de muestras de diferentes concentraciones (altas y bajas) de forma individual (valor esperado) y mezcladas en parejas en partes iguales (valor obtenido). Se calculó el porcentaje de recuperación tomando como 100% el valor Esperado: Recuperación = 100 (valor esperado/valor obtenido). Se

consideraron adecuadas las dispersiones de 100 ± 10% (8).

**Paralelismo**: Se evaluó el paralelismo del ELISA a través de la cuantificación de cinco muestras de sueros de diferentes concentraciones, en tres diluciones doble seriadas (10), cuyos valores de absorbancia quedaron en los diferentes segmentos de la curva estándar. Para cada muestra se realizaron dos réplicas de cada dilución, calculándose la concentración después de corregidas por el factor de dilución. Se determinó el CV de las concentraciones de las muestras en las tres diluciones realizadas. Se consideraron adecuados los CV menores del 10% (8).

**Análisis estadísticos**

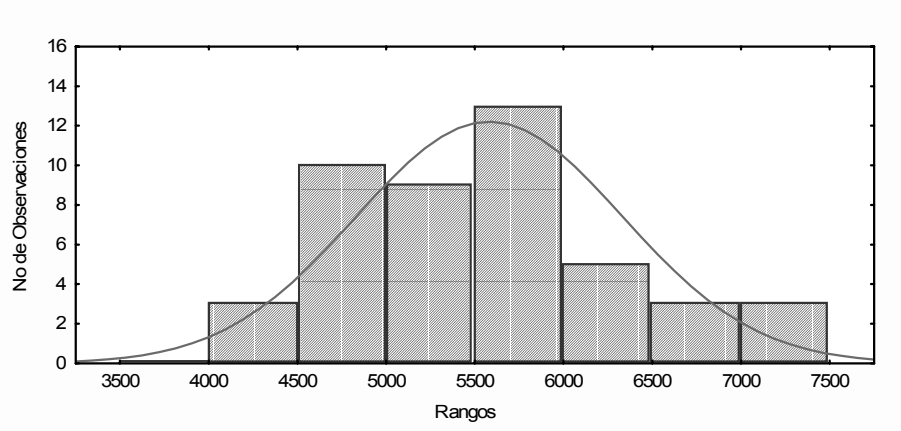
Los cálculos del CV, desviación estándar y medias se realizaron utilizando el paquete de programas Microsoft Excel 2000. El ajuste y la verificación de la curva, así como el cálculo de la concentración de los sueros se realizó a partir de la introducción de los datos al programa de cálculo ELISA (desarrollado por Brian D. Plikaytis y colaboradores del CDC, Atlanta, USA instalado en nuestra computadora (7). La cuantificación por este programa está basada en una transformación logistic-log con cuatro parámetros y compara el resultado de absorbancia de la muestra en la dilución estudiada con la curva del estándar encontrada por el propio sistema a través de un ajuste robusto. Para la distribución Normal se utilizó el programa Stadistic versión 3.0 y el test de Kolmogorov-Smirnov.

Para analizar la inmunogenicidad de vacunas hay que tener en cuenta la importancia de los inmunoensayos empleados con estos propósitos, los cuales deben normalizarse y validarse en estudios tempranos del desarrollo de todo candidato vacunal (11).

A la curva obtenida se le asignó 6000 U/mL luego de ser comparada con el estándar de DACTA. Para ser evaluada se prepararon seis puntos a partir de una dilución de 1:50 hasta 1:1600. El rango de la curva permitió cuantificar sueros entre 12 000 y 375 U/mL con la dilución de trabajo 1:100. Esta dilución fue seleccionada teniendo en cuenta que las muestras escogidas para evaluar todos los parámetros de calidad del ensayo estuvieron dentro del rango de concentración de la curva estándar, lo que nos permitió confirmar la utilidad de la dilución de trabajo seleccionada. Después que comprobamos que el suero control presentaba una distribución normal (P > 0,05) procedimos a estimar su rango de concentración como la media ± 2 DE, obteniéndose un rango de 4078 a 7085 U/mL (Figura 1). Este rango está ubicado aproximadamente entre el segundo y tercer punto de la curva estándar, lo que concuerda con lo descrito por otros autores (12). Esta muestra nos permite controlar la calidad de la preparación de la curva estándar ya que los ensayos se consideran confiables cuando el suero control muestre valores de concentración dentro del rango establecido. Otros autores recomiendan el uso de controles de media y baja concentraciones, este último en la zona del valor mínimo de protección (13).

## Resultados y Discusión

**Figura 1. Histograma de frecuencias de las determinaciones de la concentración del control positivo**



El valor del límite de detección calculado fue de 123,74 U/mL, valor inferior al punto de menor concentración de la curva para una dilución de 1:100 de la muestra.

La especificidad del ensayo se comprobó a partir de la evaluación de una mezcla de sueros de ratones inmunizados con VME de *Neisseria meningitidis* serogrupo B. La mezcla de sueros mostró una absorbancia media de 0,064, por debajo del valor de absorbancia del punto de menor concentración de la curva, por lo que pudimos comprobar que no hay reacción cruzada entre los anticuerpos del polisacárido y de la proteína. Esto es importante para nuestro trabajo, producto de que esta proteína se emplea como portadora en la obtención de conjugados vacunales.

Al ser analizada la precisión intraensayo, interensayo y total del ensayo observamos que los CV no sobrepasaron el 10% (Tablas 1 y 2), quedando dentro del rango reportado (14,15). Esto garantiza una adecuada precisión en la determinación de la concentración de las muestras en las diferentes zonas de la curva estándar. Otros autores reportan CV con valores hasta del 19% que indican una menor precisión en la técnica realizada (16), sin embargo hay trabajos que reportan sistemas ELISA con segmentos muy precisos; así como otros segmentos no tan precisos (17).

**Tabla. 1. Comparación de las variaciones intraensayo en cinco muestras de sueros de ratones inmunizados con diferentes conjugados**

| Muestras | Placa N° 1 | | Placa N° 2 | | Placa N° 3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n=10 | (U/mL) | CV(%) | (U/mL) | CV(%) | (U/mL) | CV(%) |
| 2962 | 4586,88 | 8,75 | 4307,41 | 6,18 | 3908,47 | 5,25 |
| 2963 | 3961,85 | 3,37 | 3714,87 | 9,59 | 3966,51 | 3,78 |
| 2982 | 3576,03 | 6,58 | 3438,74 | 9,89 | 3895,33 | 6,86 |
| 29103 | 1339,73 | 6,36 | 1651,27 | 6,35 | 1557,07 | 4,41 |
| 2912 | 870,01 | 6,99 | 808,91 | 6,23 | 887,28 | 6,73 |

**Tabla 2. Comparación de las variaciones interensayo y total en cinco muestras de sueros de ratones inmunizados con diferentes conjugados**

| *Muestras* | Precisión Interensayo n=3 | | | Precisión Total n=30 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Conc. (U/mL) | DE | CV(%) | Conc. (U/mL) | DE | CV(%) |
| 2912 | 855,40 | 41,18 | 4,81 | 855,40 | 64,88 | 7,59 |
| 2962 | 3881,08 | 143,96 | 3,71 | 3881,07 | 406,41 | 9,52 |
| 2963 | 4267,59 | 340,95 | 7,99 | 4267,59 | 257,20 | 6,63 |
| 2982 | 3646,37 | 222,30 | 6,10 | 3646,37 | 324,01 | 8,89 |
| 29103 | 1516,02 | 159,77 | 10,54 | 1516,03 | 157,27 | 10,37 |

Algunos autores han demostrado que cuando en el ensayo de recuperación, los valores se encuentran en el intervalo comprendido entre 100% ± 10% del valor esperado, hay una alta exactitud (8,17). Nosotros obtuvimos una recuperación del sistema para cinco muestras diferentes que se ubicó entre 99% y 106% (Tabla 3), y el valor promedio de la recuperación fue de 103%, lo que permitió afirmar el grado de concordancia entre el valor real del fármaco y el valor medido. También estos resultados de recuperación del ELISA se corresponden con los reportados por otros autores, que observaron adecuadas recuperaciones del ensayo que garantizan la exactitud del mismo (9,16).

**Tabla 3. Evaluación de la recuperación del ELISA (%) en los diferentes segmentos de la curva estándar**

| Muestras | Valor Esperado | Valor Obtenido | Recuperación |
|---|---|---|---|
| | (U/mL) | (U/mL) | (%) |
| 2912 | 1142,150 | 1208,67 | 106 |
| 2962 | 4065,76 | 4017,5 | 99 |
| 2963 | 3766,79 | 3996,74 | 106 |
| 29103 | 1324,94 | 1369,09 | 103 |
| 29133 | 2559,62 | 2531,01 | 99 |

Del análisis de la linealidad del ensayo obtuvimos los resultados que son mostrados en la Tabla 4.

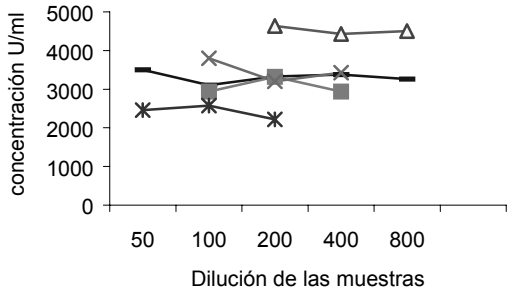
**Tabla 4. Comprobación de la linealidad de la curva estándar del ELISA**

| Muestra X | Muestra Y | Muestra X+Y | Valor Esperado | Recuperación |
|---|---|---|---|---|
| U/mL | U/mL | U/mL | U/mL | % |
| 2907,25 | 1000,36 | 1772,14 | 1953,805 | 91 |
| 3676,32 | 622,79 | 2097,62 | 2149,555 | 98 |
| 5284,16 | 515,45 | 3036,31 | 2899,805 | 105 |
| 2972,59 | 396,6 | 1615,09 | 1684,595 | 96 |

Como se observa en la Tabla 4, el porcentaje de recuperación obtenido tuvo una dispersión entre 91% y 105%, y el valor promedio fue de 97% para los cuatro pares de muestras analizadas. Estos resultados demuestran una adecuada linealidad de la curva estándar y se corresponden con los encontrados por otros autores para sistemas ELISA (9).

Del análisis del paralelismo del suero estándar con las muestras en las diferentes zonas de la curva, se observó una independencia del valor de la concentración de cada muestra de la dilución de trabajo utilizada. Estos resultados se comprueban al observarse CV menores del 10% para todas las muestras, independientemente de las diluciones en las que las mismas fueron analizadas (Figura 2).

**Figura 2. Estudios de paralelismo en los distintos segmentos de la curva estándar -: Muestra 2962 (CV=5,27%); ■: Muestra 2963 (CV=4,43%); ⋆ : Muestra 29133 (CV=9%); x: Muestra 29132 (CV=6,23%); Δ: Muestra 2982 (CV=5,53%)**




Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores para ensayos ELISA indirectos (9,18).

Estos resultados son necesarios para garantizar la calidad de los mismos en la fase investigativa, estudios preclínicos y en las distintas fases de los ensayos clínicos (11).

Las ventajas que nos proporciona este ELISA son: la rapidez, sencillez, la adecuada sensibilidad y precisión que genera resultados muy reproducibles, así como que es un método económico y práctico que es factible de realizar en gran cantidad de laboratorios sin necesidad de grandes equipamientos y personal altamente calificado.

Este ELISA, posterior a su validación está siendo utilizado en los diferentes estudios de inmunogenicidad en ratones, en los cuales se evalúan diversos candidatos vacunales que contienen al polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C como antígeno vacunal.

## Referencias


1. Poolman JT. Development of a meningococcal vaccine. *Infect Agents Dis.* 1991; 4:13-28.
2. Peeters C.C.A, Tenbergen-Meekes, A.M., Poolman Beurret J.T., Zegers M., B.J.M. and Rijkers G.T. Effect of carrier priming on immunogenicity of Saccharide–Protein conjugate vaccine. *Infect and Immun.* 1991; 59 (10):3504-3510.
3. POOLMAN JT. Polysaccharides and Membrane Vaccines. In A. Mizrahi (ed.), *Bacterial vaccines*. New York: Wiley-Liss, 1990; 57-86.
4. Lieberman JM, Chiu SS, Wong VK, Partridge S, Chang SJ, Chiu CY. Safety and inmunogenicity of a serogroups A/C. *Neisseria meningitides* oligosaccharide- protein conjugate vaccine in young children. *JAMA*. 1996; 275:1492-1503.
5. Guide for the care and use of laboratory animal. EEC council Directive 86 / 609, OJL 358, 1, Dec. 12, 1987.
6. Nerey, M. Normalización de un ELISA cuantitativo para IgG anti-polisacárido del meningococo serogrupo C. Estudio de la respuesta immune humoral en vacunados con VA-MENGOC-BC®. Tesis de Grado. Ciudad de La Habana, Cuba: Universidad de La Habana; 1992.
7. Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparinsons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microb.* 1991; 29(7): 1439-1446.
8. 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. European Committee for Clinical Laboratory Standards. 1986; 3(3).
9. Kuhlmann WD, Rieger J. Diphtheria immunity of a west German population by measurement of antitoxin antibodies with enzyme-linked immunosorbent assay. *Immunol Infect Dis.* 1995; 5:10-14.
10. Camargo ME, Silveira L, Furuta JA, Oliveira EPT, Germek OA. Immunoenzymatic assay of antidiphtheric toxin antibodies in human serum. *J Clin Microb.*1984; 20(4):772-4.
11. Ochoa R.A, Martínez J.C, Estrada E, *et al.* Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor*. 1999; 8(10):9-13.
12. Ochoa R, Martínez JC, Fernol X, *et. al*. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor*. 2000; 9(3): 13-18.
13. Plikaytis BD, Holder PF, Pais LB, Maslanka SE; Gheesling LL, Carlone GM. Determination of parellelism and nonparallelism is bioassay dilution curves. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:2441-2447.
14. Guía de la OMS sobre los Requisitos de las Prácticas adecuadas de Fabricación (PAF). 1998

15. Nerey M, Ochoa R, Martínez JC, et. al. Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG humana anti-polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C. *Biotecnología Aplicada*. 1999; 16:113-115.
16. Andersen J, Berthelsen L, Lind I. Measurement of antibodies against meningococcal capsular polysaccharides B and C in enzyme-linked immunosorbent assays: towards an improved surveillance of meningococcal disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 1997; 4:345-51.
17. Aggerbeck H, Norgaard-Pedersen B, Heron I. Simultaneous quantitation of diphtheria and tetanus antibodies by double antigen, time-resolved fluorescence immunoassay. *J Immunol Methods.* 1996; 171-183.
18. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. *Validation of analytical assays.* WHO Geneva. 1997; 65-95.
19. Cruces A. *Estandarización de un ELISA para la cuantificación de antitoxina diftérica en sueros humanos.* Tesis de Grado. Ciudad de La Habana, Cuba: Universidad de La Habana. 1998.

## Validation of the ELISA for quantifying capsular anti-polysaccharide IgG of *Neisseria meningitidis* of the serogroup C in mice sera

### Abstract

An indirect enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) was developed to determine antibody anti-polysaccharide C mouse IgG. Polystyrene plates precoating with poly-L-lysine, then *Neisseria meningitidis* group C polysaccharide (Finlay Institute, Havana, Cuba) was used to evaluated the immune response against this component in a candidate vaccine in pre-clinical studies. Alkaline phosphatase conjugate was used for recognizing mouse antibodies against polysaccharide C. The enzymatic reaction is evidenced by using the specific substrate p-nitrophenylphosphate. The detection limit of the assay was 123,74 U/mL, the specificity of assay was high. Intra-and interassay lack of precision, parallelism, linearity, and recovery were ± 10% of the expected values.

**Keywords**: Antipolysaccharide C ELISA, *Neisseria meningitidis* serogroup C, validation.