

Competencia por los antígenos de VA-MENGOC-BC® entre los isotipos IgG e IgA presentes en el suero de individuos vacunados

Eric A. Estrada, Juan C. Martínez, Enelis Reyes, Ana M. García, Mayté Nerey, Tania Licea, Iovagna Bravo, Xenia Ferriol, Rosa Blanco, Yaima Merchán.

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

Las altas concentraciones de IgG en suero hacen pensar que pueda existir una interferencia en la cuantificación de la IgA, justificada por el hecho de una competencia entre estos dos isotipos por las proteínas de VA-MENGOC-BC®. En este trabajo se presenta un estudio sobre la detección cuantitativa de IgA específica contra los componentes proteicos de VA-MENGOC-BC® en sueros de individuos que recibieron un esquema completo de dicha vacuna. Fue eliminada la actividad específica de la IgG por medio de un proceso de purificación, empleando una columna de afinidad de proteína G. La determinación de ambos isotipos (IgA e IgG) se realizó por ELISA antes y después de haber sometido los sueros a la cromatografía. Del total de 46 muestras de sueros cuantificadas de IgA específica contra PV, el 89% presentaron títulos de anticuerpos antes de someterlas a la cromatografía. Una vez eliminada la IgG el 86,9% mostraron incremento de los títulos de IgA. A partir de estos resultados surge la necesidad de la reevaluación de la cinética de respuesta de IgA en grupos de individuos vacunados.

Palabras claves: *Neisseria meningitidis*, isotipos de Igs, IgA Sérica, IgG, vacuna antimeningocócica.

Introducción

Los componentes proteicos (PV) de la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC® desencadenan una respuesta humoral con características de timo dependencia, existiendo incrementos de la concentración de IgG e IgA específica, los cuales son mayores para la IgG, fundamentalmente después de la segunda dosis. Las curvas de la cinética de Acs estimulados por esta vacuna sugieren la interacción de los tres isotipos en la dinámica de la respuesta (1).

Los resultados de los estudios de IgA, específica contra las proteínas de la membrana externa (PME) del meningococo son contradictorios y no han permitido determinar una función concreta de este isotipo en los mecanismos inmunológicos protectores. Hasta hace poco tiempo se pensó que la IgA no era bactericida para meningococos cuando se une a polisacáridos capsulares y, además, bloquea la lisis mediada por el complemento, iniciada por la IgG e IgM (2, 3, 4). Sin embargo, recientemente se ha observado que la IgA1 puede desencadenar la muerte de la *Neisseria meningitidis* (Nm) mediada por el complemento, cuando se une a las PME, por medio de un evento Fc dependiente y requiere la vía clásica funcional, pues la vía alterna es insuficiente para mediar la bacteriolisis y quizás esté restringida a amplificar la vía clásica (5, 6, 7).

Los antígenos proteicos inducen preferentemente IgA1, que predomina en el suero (8), mientras que los antígenos polisacáridicos inducen una proporción relativamente mayor de IgA2 (9). Las altas concentraciones de IgG específicas a PV hacen pensar que pueda existir una interferencia de este isotipo en la cuantificación de la IgA e IgM, justificada por el hecho de una competencia antigénica entre estos isotipos

(1). Por todas estas razones expuestas anteriormente, es de gran utilidad el estudio de la actividad y funcionalidad de la IgA libre de la actividad de IgG. Con este trabajo se pretendió utilizar una metodología que permitiera eliminar la IgG de muestras séricas de individuos vacunados con VA-MENGOC-BC® y, posteriormente, medir la actividad IgA sérica específica contra las Proteínas de Membrana Externa (PME) de Nm.

Materiales y Métodos

Se determinó la concentración de IgA específica contra las PV en 46 muestras de sueros de vacunados con VA-MENGOC-BC® a través de ELISAs indirectos, desarrollados por el Laboratorio de Inmunoquímica de la Dirección de Asistencia Científico Técnica Aplicada (DACTA) del Instituto Finlay (1). Los sueros problemas fueron sometidos a un proceso de purificación, utilizando una columna de afinidad con proteína G Sepharosa 4 Fast Flow, con el objetivo de absorber todas las subclases de IgG para eliminar la posible interferencia de dicho isotipo en este ensayo. La IgG e IgA fueron cuantificadas en cada suero antes y después de eliminar el primer isotipo. Para el análisis de los datos se utilizó el programa Statgraphics versión 4.0 (1985-1989). Los valores de IgG e IgA séricas, cuantificados por ELISA, fueron transformados a escala logarítmica para la realización de un análisis de regresión simple.

ELISA para determinar los isotipos IgG e IgA

Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar EIA/RIA Cat. No 3590) con PV a una concentración de 20 µg/mL en Tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6; se incubó durante 16 horas a 4°C en cámara húmeda. El diluyente empleado para el ensayo fue Leche descremada al 3% p/v Tween 20 al 0,05% v/v. Se hicieron 7 diluciones dobles seriadas a partir de 1/20 del suero estándar (suero

humano con alto título al cual se le asignaron 380 U/mL arbitrarias). Fueron utilizados conjugados anti-IgG y Anti-IgA humana-fosfatasa alcalina (Sigma Cat). (No A-0287 y No A-9669, respectivamente). Se utilizó como sustrato el PNPP a 1 mg/mL en Tampón dietanolamina, pH 9,8. La lectura se realizó a 405 nm. La concentración se obtuvo por medio de un programa de cálculo ELISA.

Eliminación de la actividad del isotipo IgG de los sueros por medio de proteína G Sepharosa 4 Fast Flow

La columna fue empacada con 3 mL de proteína G Sepharosa 4 Fast Flow. Se equilibró la misma con Fosfato de sodio 0,05 M, pH 7. Luego 0,5 mL de las muestras de sueros se aplicaron a la columna. La elución de la muestra se realizó a una velocidad de flujo de 6 gotas/min. con la solución de equilibrio. Después se procedió a despegar la IgG con buffer glicina-HCL 0,1 M pH 2,7. Se equilibró nuevamente la columna con 20 mL de solución de equilibrio (10, 11). Como control de la cromatografía se realizó inmuno-electroforesis a las muestras antes y después de la purificación. También se estudió por ELISA la cinética de la actividad de IgA anti PV en la fracción colectada y la despegada.

Resultados y Discusión

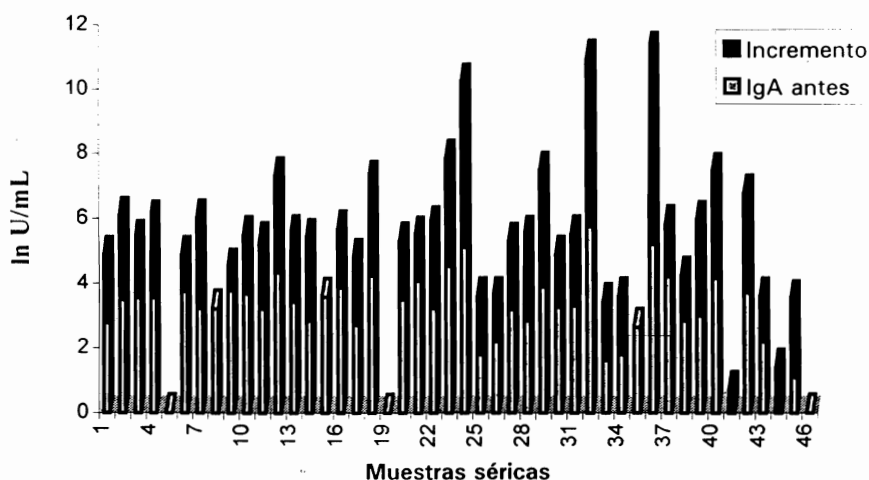
La evaluación cualitativa y cuantitativa de la IgA sérica se ha realizado sin tener en cuenta la posible interferencia de la subclase IgG (1). Por esto se hizo necesario utilizar una metodología que permitiera conocer si existe o no esta interferencia en la cuantificación de IgA sérica, específica a las proteínas de VA-MENGOC-BC®, presentes en las muestras de individuos vacunados con esta vacuna.

Las diferencias de concentración y afinidad de anticuerpos de diferentes isotipos, específicos para un mismo antígeno, es un elemento a tener en cuenta cuando se quiere cuantificar el isotipo en desventaja, pues la competencia por la unión al antígeno es evidente. Las variantes más aplicadas para resolver este problema son: diluir el suero para que el antígeno en la fase sólida tenga un exceso molar relativo con relación al anticuerpo, incrementar la concentración del antígeno en la fase sólida y eliminar el anticuerpo de mayor concentración y aversez (12). En este ensayo se realizará la tercera variante porque la IgA, que está presente en baja concentración sérica, podría pasar inadvertida por perder sensibilidad el sistema al diluir las muestras. Por otra parte, está demostrado que 20 µg/mL de PV es la concentración óptima para saturar la fase sólida (1, 13, 14).

Se asignó arbitrariamente U/mL al suero estándar debido a la carencia de métodos comunes para determinar la cantidad de masa por mL en el mismo. La expresión de la actividad absoluta en mg/mL es difícil y polémica porque el valor absoluto de esa señal representa la cantidad total de este anticuerpo en el mismo y no la cantidad funcional contra el antígeno (12).

Del total de 46 muestras de sueros cuantificadas de IgA específica contra PV antes de someterlas a la cromatografía, el 89% presentaron títulos de anticuerpos de este isotipo. Una vez eliminada la IgG, el 86,9% mostraron incremento de los títulos de IgA y dentro de éstas hubo dos muestras que no presentaron títulos antes del proceso de purificación (Gráfico 1).

Gráfico 1. IgA anti PV (U/mL) antes de la cromatografía y su incremento en las alícuotas sin IgG



Este incremento puede ser explicado por la existencia de competencia por los mismos epítopes proteicos fijados a la

fase sólida entre estos dos isotipos, o por el contrario se reconocen epítopes diferentes pero debido a la cercanía

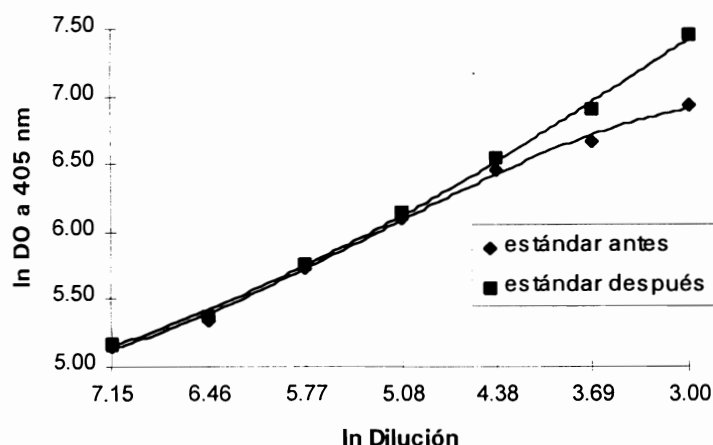
espacial se produce una interferencia alostérica. Estos resultados coinciden con los de otros investigadores, quienes han encontrado el efecto de inhibición competitiva, cuantificando IgE humano (15, 16) e IgA en otras especies (17).

Resultó atípico el hecho de que en dos casos, de los seis sueros donde no hubo un incremento después de la purificación, se observó una disminución de la IgA después del proceso de purificación. Una posible explicación de este fenómeno puede ser que factores intrínsecos a estos dos sueros, como el factor reumatoideo de tipo IgA (18), fueran

responsables de un falso positivo antes del proceso cromatográfico. Este factor pudo haber reconocido la IgG específica, unida a las proteínas del recubrimiento, y posteriormente ser reconocido por el conjugado anti IgA utilizado.

Al analizar estadísticamente los datos fue observada una relación de tipo lineal con pendiente positiva de 0,55 ($p < 0.0005$) entre los títulos iniciales de IgG y los incrementos de los títulos de IgA al pasar la muestra por la matriz de afinidad.

Gráfico 2. Comportamiento de las curvas del suero estándar antes y después de la cromatografía de afinidad



La representación gráfica de las curvas del estándar antes y después del proceso cromatográfico, refleja una distorsión en la región superior de la curva con disminución de la pendiente en la muestra con IgG, respecto a la sometida a la cromatografía de afinidad (Gráfico 2). La distorsión puede ser por impedimento estérico, competencia entre dos isotipos específicos contra un mismo antígeno y/o por inhibición no competitiva de factores en la muestra (19). Reiteramos que en nuestro caso la competencia de la IgG e IgA por la unión a las proteínas de la fase sólida, es el factor responsable de la distorsión, sin descartar la posibilidad de un fenómeno de impedimento estérico.

Referencias

- Fernández JA. Cinética de la actividad bactericida sérica y de los isotipos IgG, IgA e IgM estimulados por los componentes inmunogénicos de la vacuna meningocócica VA-MENGOC-BC¹. *Advances in modern Biotechnology*. 1994; 2:31.
- Jarvis GA, Griffiss JM. Human IgA1 blockade of IgG-initiated lysis of *Neisseria meningitidis* is a function of antigen-binding fragment to the polysaccharide capsule. *J. Immunol*. 1991;147:1962-1967.
- Kilian M, Mestecky J, Russell MW. Defense mechanisms involving Fc-Dependent function of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol. Rev*. 1988;52:296-303.
- Hamadch RM, Estabrook MM, Zhou P, Jarvis GA, Griffis JM. Anti-Gal bind to Pili of *Neisseria Meningitidis*: the immunoglobulin A isotype blocks complement-mediated killing. *Infect. Immun*. 1995;63:4900-4906.
- Jarvis GA, Li J. Complement component C1q is required for IgA1 initiated killing of *Neisseria meningitidis* In: Zollinger WD, Frasch CE, Deal CD. eds. *Abstract of the Tenth International Pathogenic Neisseria Conference. Baltimore, Maryland, USA*; 1996:287-288.
- Jarvis GA, Griffiss JM. Human IgA1 initiates complement-mediated killing of *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol*. 1989;143:1703-1709.
- Brooks GF, Lammel CL, Blake MS, Kusecek B, Achtman M. Antibodies against IgA1 Protease are stimulated both by clinical disease and asymptomatic carriage of serogroup A *Neisseria meningitidis*. *J. infect. Dis*. 1992;166:1316-1321.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. 2nd Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia: 1994.
- Russell MW, Lue C, Van den Wall Bake AWL, Moldeveanus Z, Mestecky J. Molecular heterogeneity of human IgA antibodies during the immune response. *Clin. Exp. Immunol*. 1992;87:1-6.
- Akerström B, Brodin T, Reis K, Björck L. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol*. 1985;135:2589-2592.
- Anónimo. Protein G and Protein G Sepharose 4 Fast Flow. Pharmacia LKB; 1988:1-6.
- Butler JE, Hamilton HM. Quantitation of specific antibodies: Methods of expression, standards, solid-phase considerations, and specific application. In: Butler JE, ed. *Immunochemistry*

- of *Solid-Phase Immunoassay*. Florida: CRC press; 1991:173-198.
13. Nerey M, Malberty JA. Normalización de un ELISA cuantitativo para IgG anti-polisacárido del meningococo del serogrupo C. Estudio de la respuesta inmune humoral en vacunados con VA-MENGOC-BC®. [Trabajo de Diploma]. Ciudad de La Habana: Instituto Finlay; 1992.
 14. Echeverry ML, Malberty JA, Galeana LA, Sotolongo FT, Galguera MA, Montoy CM, y otros. Respuesta inmune a las proteínas de una vacuna antimeningocócica BC en un ensayo realizado en Antioquia, Colombia. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 1995;118:285-294.
 15. Metzger WJ, Butler JE, Peterman JH, McGivern PL. Immunoglobulin IgE. Determination of isotype antibody In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M, eds. *Methods of immunoenzymatic Analysis*. Vol.10. Weinheim, West Germany: VCH Publishers; 1986.
 16. Haba S, Nisonoff A. Quantitation of IgE antibodies by radioimmunoassay in the presence of nonIgE antibodies of the same specificity. *J. Immunol. Methods*. 1985;85:39.
 17. Butler JE, Heo Y, Adams P, Richerson HB. The antigen-limited nature of microtiter ELISA requires partial depletion of IgG to permit reliable determination of rabbit serum IgA antibody activity. *Mol. Immunol.* 1990;27:319.
 18. Eggelmeijer HG, Otten HG, de Rooy HH, Daha MR, Breedveld Significance of Rheumatoid Factor isotypes in Seronegative Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology Internacional*. 1990;10:43-46.
 19. Jeffrey HP. Immunochemical considerations in the analysis of data from non-competitive solid-phase immunoassay. In: Butler JE, ed. *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay*. Florida, USA, CRC press; 1991:47-65.

Competition of Antigens of VA-MENGOC-BC® between Isotopes IgG and IgA present in sera of Vaccinated Subjects

Abstract

The high concentration of IgG could alter the measuring of IgA because of the antigenic competition between this immunoglobulin. We developed a quantitative method to detect seric human IgA anti-VA-MENGOC-BC proteins after IgG was eliminated by affinity chromatographic (Protein G Sepharose® 4 Fast Flow). 46 human serum were collected after the last dose of this vaccine. The quantification of IgG and IgA was carried out by an indirect ELISA before and after the chromatographic separation. 89 percent of the samples showed IgA titers before the chromatographic separation and 86.9 percent increased the IgA titers after the separation.

Key words: *Neisseria meningitidis*, antimeningococcal vaccine, IgG, seric IgA, Ig Isotypes.

Recibido: 28-4/97

Aprobado: 19-2/98