

Validación de un ELISA para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas humanas anti polisacárido capsular de *Salmonella typhi*

Juan C. Martínez, Rolando F. Ochoa, Eric A. Estrada, Luis Riverón, Marta González, Xenia R. Ferriol, Ana M. García, Rosa Blanco, Franklin T. Sotolongo.

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

Se desarrolló un ELISA indirecto contra el polisacárido capsular de *Salmonella typhi* para evaluar la respuesta inmune a la vacuna cubana de polisacárido Vi contra la fiebre tifoidea. Primeramente las placas de poliestireno fueron recubiertas con Poli-*I-Lisina* (Sigma) y con el antígeno polisacárido capsular de *Salmonella typhi* purificado en el Instituto Finlay. Luego las placas fueron incubadas con las muestras de suero humano. Los anticuerpos fueron detectados posteriormente por la adición de un conjugado anti inmunoglobulinas polivalentes humanas / Fosfatasa Alcalina (Sigma) el cual se une a los anticuerpos anti polisacárido Vi, evidenciándose la reacción por la degradación del sustrato específico (p-Nitrofenil Fosfato). La detectabilidad del ensayo fue de 0,045 unidades de Hemaglutinación por mL de inmunoglobulinas específicas en suero humano. Las imprecisiones medias (intraensayo e interensayo) y las desviaciones de la recuperación y el paralelismo, fueron inferiores a 10%.

Palabras claves: *Salmonella typhi*, polisacárido Vi, ELISA anti polisacárido Vi.

Introducción

La fiebre tifoidea es una grave enfermedad que ocurre frecuentemente en muchos países subdesarrollados. Su control requiere la descontaminación de las aguas, un efectivo tratamiento de desechos junto al diagnóstico y tratamiento rápido de pacientes y portadores asintomáticos. Esto no es posible en muchos países donde la enfermedad es endémica o epidémica, donde aún no ha sido controlada por vacunación debido a las limitaciones de las vacunas existentes (1).

La historia de la vacunación contra esta enfermedad data de hace más de 100 años con la aplicación de vacunas del microorganismo completo inactivado con calor (2). Se han realizado varias mejoras a las vacunas inactivadas, pero persisten serios problemas debido a reacciones locales y sistémicas (3). Con el empleo de una vacuna oral obtenida a partir de una cepa atenuada de *Salmonella typhi* (Ty21a) no se reportan estos problemas, pero se han informado cifras variables de eficacia. Esto, unido a la necesidad de múltiples dosis para lograr adecuados niveles de eficacia, pone en desventaja esta vacuna con respecto a otras (3).

La vacuna de polisacárido capsular de *S. typhi* presenta varias ventajas; primero, la de provocar escasas reacciones adversas, muy similares a las producidas por otras de polisacáridos capsulares purificados. Segundo, el empleo de una sola dosis logra tanta protección como dos de la vacuna celular inactivada y tres o cuatro de la vacuna oral de cepa atenuada (Ty21a). Tercero, la existencia de métodos fisicoquímicos verificados en otras vacunas polisacáridicas,

que permiten su obtención y control de forma segura y estandarizada. Todo esto, unido a su alta estabilidad a temperatura ambiente, la convierten en la variante más favorable para productores y consumidores (1).

Para la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas polisacáridicas contra la fiebre tifoidea se acude al análisis de los incrementos alcanzados producto de la vacunación, debido a la carencia de patrones internacionales de referencia para la cuantificación de los niveles de anticuerpos anti polisacárido capsular de *S. typhi* (3). El ELISA constituye una técnica muy ventajosa para la evaluación de estos niveles de anticuerpos.

En el presente trabajo se llevó a cabo la estandarización de un ELISA (4) para la evaluación en humanos de la inmunogenicidad inducida por la vacuna de polisacárido capsular de *S. typhi* desarrollada en nuestro Instituto.

Materiales y Métodos

Antígeno

El polisacárido capsular de *S. typhi* (Poli Vi) utilizado para el recubrimiento de la fase sólida del ELISA fue suministrado por la Planta de Producción del Instituto Finlay (Lote p-7005).

Preparación de la curva estándar

Para la preparación del estándar se analizaron sueros de trabajadores del Instituto Finlay que constituyen un grupo de riesgo. Estos trabajadores fueron inmunizados con la vacuna

comercial de Poli Vi producida por PASTEUR MÉRIEUX SV (TYPHIM Vi, Lote M1226), según normativas laborales. Se preparó una mezcla con los sueros que presentaron títulos anti Poli Vi mayores de 1:8 por la técnica de Hemaglutinación Pasiva (5) (cortesía del Laboratorio de Investigaciones de Procesos, Instituto Finlay). Esta mezcla mostró un título anti Poli Vi de 1:16, por lo que para su empleo en la confección del estándar del ELISA se le asignaron 16 unidades de hemaglutinación por mL (UHA/mL). La curva estándar se confeccionó con 6 puntos obtenidos por diluciones dobles seriadas a partir de un primer punto diluido con albúmina humana al 6% (v/v) en Solución Salina Tamponada con Fosfato 0,15 M pH 7,2-7,4 (SSTF) hasta una concentración de 3,2 UHA/mL.

Suero control

El suero control se confeccionó diluyendo la mezcla de suero humano con albúmina humana al 6% (v/v) en SSTF hasta que su densidad óptica (diluida 1:200) en el sistema ELISA, se encontrara entre el tercero y cuarto punto de la curva estándar. Para la determinación del rango de aceptación del suero control se realizaron 480 repeticiones de la muestra y se definió el mismo como el valor promedio \pm 2 desviación estándar (DE) (4). La comprobación de la normalidad se realizó por la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0,05$). Todos los cálculos estadísticos fueron realizados en Statgraphics® plus para Windows (6).

Ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de anticuerpos anti poli Vi

Se diseñó un sistema ELISA tipo indirecto en el cual se utilizaron placas de poliestireno (Costar 3590, EUA). El volumen empleado de cada reactivo en la realización del ensayo fue de 100 μ L. Se empleó para el recubrimiento de la fase sólida una solución de Poli-I-Lisina de 3 μ g/mL en SSTF y se incubó la placa por 30 minutos a una temperatura de 20 a 25 °C. Se realizaron cuatro lavados con SSTF a intervalos de 30 segundos y se adicionó Poli Vi a una concentración de 40 μ g/mL diluido en SSTF. Todos los lavados posteriores se realizaron con SSTF con 0,05% (v/v) de Tween 20 (SSTF-T). La placa se incubó de 16 a 20 h a 4 °C y se lavó. Se adicionaron las muestras en estudio, el estándar y el control del ensayo, diluidos en leche desnatada al 3% (p/v) en SSTF-T (Merck) y se incubaron 1 h a 37 °C. Se realizaron los lavados y se añadió un conjugado polivalente anti inmunoglobulinas humanas acopladas a la fosfatasa alcalina (Sigma A-5034). Se dejó reaccionar durante 1 h a 37°C. Finalmente se realizaron los últimos lavados y se añadió el sustrato p-Nitrofenil Fosfato (Sigma) a una concentración de 1 mg/mL en Solución reguladora Dietanolamina 0,92 M, pH 9,8. Se incubó durante 30 minutos en la oscuridad, período en que el punto más concentrado de la curva estándar debió alcanzar a 405 nm una densidad óptica de 1,4 a 1,5. Al cabo de este tiempo se realiza la lectura en un lector de MicroELISA Anthos Labtec.

La cuantificación se realizó mediante un programa que utiliza una transformación logistic-log con cuatro parámetros, aportado por el CDC de Atlanta, EUA (7).

Parámetros de calidad del ensayo

Para evaluar las características del sistema se analizaron los parámetros siguientes:

◆ Concentración mínima detectable

Se realizaron 40 repeticiones del blanco reactivo (leche desnatada al 3% (p/v) en SSTF-T) y se calculó el promedio + 2 DE (4, 8).

◆ Precisión del sistema

La variación intraensayo se comprobó empleando cinco sueros de concentraciones que estuvieran en el rango de la curva patrón, realizando 10 repeticiones de cada muestra en tres placas diferentes.

La variación interensayo utilizó la información de ensayos diarios durante tres días, comparando las medias de cada placa. El coeficiente de variación (CV) se usó para estimar la variación estadística de la media entre las réplicas (4, 8).

◆ Exactitud

Se analizó el recobrado, seleccionándose para ello una muestra libre de anticuerpos contra el Poli Vi, a la que se le añadieron diferentes volúmenes de cinco muestras de sueros de concentración conocida (4). El recobrado se analizó por medio de la fórmula:

$$\left(\frac{\text{Media del valor medido}}{\text{valor teórico de concentración}}\right) \times 100.$$

◆ Evaluación de la curva estándar (Paralelismo)

Se analizaron seis muestras de sueros en tres diluciones dobles seriadas, midiéndose sus valores de concentración previa corrección con el factor de dilución. Se calculó la media, la DE y el CV entre las réplicas para cada muestra (4, 8).

Resultados y Discusión

La curva estándar permitió cuantificar muestras entre 32 y 1 UHA/mL con la dilución de trabajo de 1:200 y entre 3,2 y 0,045 UHA/mL en la dilución 1:20, ya que este último valor resultó ser la concentración mínima detectable del ensayo (Media + 2DE). En estas diluciones los valores de concentración de anticuerpos anti Poli Vi de la mayoría de las muestras estudiadas se encontraron dentro del rango cuantificable de la curva estándar (resultado no mostrado), lo que permitió confirmar la utilidad de las diluciones de trabajo seleccionadas.

La concentración de anticuerpos anti Poli Vi del suero control mostró una distribución normal y se ubicó entre el tercero y el

cuarto punto de la curva (resultado no mostrado). El suero control mostró un rango de aceptación entre 3,26 y 6,05 UHA/mL. Este rango permitió controlar la calidad de preparación de la curva estándar, ya que los ensayos sólo deben ser aceptados cuando el suero control muestre valores de concentración dentro del mismo.

En el análisis de la precisión, los coeficientes de variación intraensayo e interensayo no sobrepasaron el 15%, con un

valor medio inferior al 10%; valores aceptables para este tipo de técnica (Tablas 1 y 2). Otros trabajos reportan coeficientes de variación de hasta un 19%, los que indican una menor precisión en la técnica desarrollada (9).

Los resultados obtenidos en este trabajo garantizan una adecuada precisión en la determinación de concentraciones de muestras en diferentes zonas de la curva estándar.

Tabla 1. Precisión Intraensayo

Muestras (n=10)	Placa 1		Placa 2		Placa 3	
	X (UHA/mL)	CV (%)	X (UHA/mL)	CV (%)	X (UHA/mL)	CV (%)
1	27,313	6,00	24,022	7,11	22,734	8,41
2	8,453	10,23	7,704	12,56	7,056	11,22
3	3,026	6,29	3,319	10,11	3,329	6,42
4	0,802	4,84	0,671	8,50	0,679	6,31
5	0,273	8,33	0,222	9,76	0,241	8,39
Promedio	-	7,14	-	9,61	-	8,15

X = Promedio.

CV = Coeficiente de Variación.

Tabla 2. Precisión Interensayo

Interensayo n=3			
	X(UHA/mL)	DE (UHA/mL)	CV (%)
1	24,689	2,3612	9,56
2	7,712	0,6596	8,55
3	3,225	0,1720	5,33
4	0,717	0,0732	10,20
5	0,245	0,0261	10,64
Promedio	-	-	8,86

X = Promedio.

DE = Desviación Estándar.

CV = Coeficiente de Variación.

El recobrado del sistema para cinco muestras diferentes se ubicó desde 98% a 109% y el valor promedio del recobrado fue del 103,16%, lo que permitió afirmar la alta exactitud obtenida al encontrarse todos los valores en el intervalo comprendido por $\pm 10\%$ del valor esperado (Tabla 3) (4, 8).

La prueba de paralelismo de las muestras ensayadas, mostró una independencia del valor de la concentración de cada muestra de la dilución de trabajo utilizada, para el rango de medición evaluado. La prueba exhibió un coeficiente de variación entre las muestras inferior al 10% (Figura 1).

Tabla 3: Ensayo de Recuperación

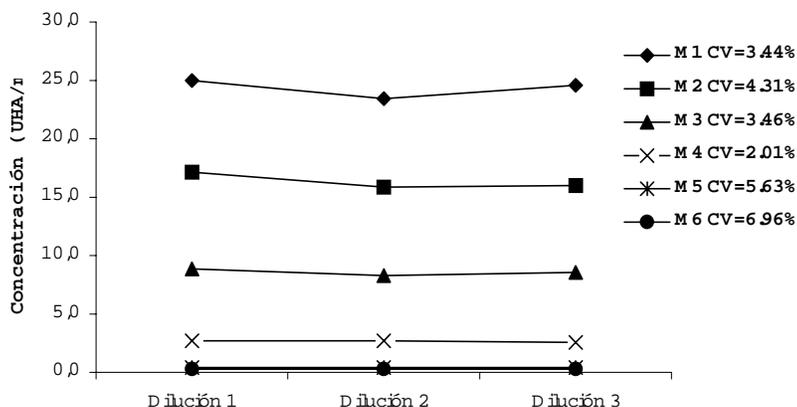
Muestra n=10	Valor Esperado (UHA/mL)	Valor Obtenido (UHA/mL)	Recuperación (%)
1	0,308	0,338	109,74
2	0,771	0,762	98,83
3	8,103	8,029	99,09
4	9,533	9,610	100,81
5	15,218	16,332	107,32
Promedio	-	-	103,16

Al no existir aún patrones internacionales de referencia para cuantificar anticuerpos anti Poli Vi se acudió al análisis de los incrementos alcanzados debido a la vacunación, para evaluar los niveles de protección contra la fiebre tifoidea (3, 10).

La alta precisión y exactitud del ELISA estandarizado lo hacen adecuado para evaluar la respuesta de anticuerpos anti polisacárido capsular de *Salmonella typhi*. Este ELISA permitirá evaluar la efectividad de la Vacuna

Cubana de Polisacárido Vi contra la fiebre tifoidea.

Figura 1. Análisis del paralelismo de la curva estándar



Referencias

- 1- Fanning WL. Typhim Vi™ Vaccine. *J. Travel. Med.* 1997;4:32-37.
- 2- Salmon DE, Smith T. On a new method of producing immunity from contagious diseases. *Rev Am Vet* 1886;10:63-69.
- 3- Plotkin SA, Bouveret-Le Cam N. A new Typhoid Vaccine Composed of the Vi Capsular Polysaccharide. *Arch. Intern. Med.* 1995;155:2293-2299.
- 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*:1997.
- 5- Tacket CO, Ferreccio C, Robbins JB, Tsai C-M, Schulz D, Cadoz M, Goudeau A, Levine MM. Safety and immunogenicity of two *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine. *J. Infect. Dis.* 1986;154:342-345.
- 6- STATGRAPHICS Plus for WINDOWS [computer program]. Version 1.0. Statistical Graphics Corp, USA, 1994.
- 7- Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29:1439-1446.
- 8- 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. European Committee for clinical laboratory standard, 1986.
- 9- 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;4:345-351.
- 10- Kossaczka Z, Bystricky S, Bryla DA, Shiloach J, Robbins JB, Szu SC. Synthesis and immunological properties of Vi and Di-O-Acetyl Pectin protein conjugates with Adipic Acid Dihydrazide as the linker. *Infect. Immun.* 1997;65:2088-2093.

Validation of an ELISA for the quantification of seric anticapsular *S. typhi* polysaccharide human immunoglobuline

Abstract

An indirect ELISA against capsular polysaccharide of *Salmonella typhi* was developed to evaluate the immune response to the Polysaccharide Vi vaccine) vaccine against the typhoid fever. The polystyrene plates were first coated with Poly-L-Lysine (Sigma) and polysaccharide antigen purified in the Finlay Institute. Then the plates were incubated with human serum samples. Antibodies anti polysaccharide Vi were detected by addition of anti-human Polyvalent Immunoglobulins / alkaline phosphatase conjugate (Sigma), and the reaction was developed by the substrate specific degradation (p-Nitrophenyl Phosphate). The detection limit of the assay was 0,045 Units of Haemagglutination per mL of specific immunoglobulins in human serum. Intra and inter assay unprecision were below 10%. Parallelism, and recovery were $\pm 10\%$ of expected values.

Keywords: *Salmonella typhi*, polysaccharide Vi, anti polysaccharide Vi ELISA.