

Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG humana anti-polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C

Mayte Nerey Olivares, Rolando Ochoa Azze, Juan C Martínez Rodríguez, Tania Licea Verdecia, Xenia Ferriol Marchena, Ana M García Malberti, Rosa Blanco González, Eric Estrada González

DACTA, Instituto "Finlay". Ave 27 No 19805. AP 16017, CP 11600, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 33 6754; E-mail: ochoa@finlay.edu.cu

ABSTRACT

An indirect ELISA against capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C was developed to evaluate the immune response to this component of VA-MENGOC-BC® Cuban vaccine. Polystyrene plates coated with poly-L-lysine and polysaccharide antigen ("Finlay" Institute), are first incubated with human serum samples. Antibodies are detected by addition of anti-human IgG/alkaline phosphatase conjugate, which recognizes antibodies against polysaccharide C. The enzymatic reaction is evidenced by processing of the specific substrate p-nitrophenylphosphate. The detection limit of the assay is 367 U/mL of specific IgG in human serum. Intra- and interassay lack of precision was below 10%. Parallelism, linearity and recovery were $\pm 10\%$ of the expected values. The relation between the standard of the "Finlay" Institute and the PB2 standard from the Center for Disease Control (CDC), Atlanta, USA, was determined. The regression equation was $CDC = 0.5398 \text{ Finlay} + 143$.

Keywords: anti-polysaccharide C ELISA, *Neisseria meningitidis*, polysaccharide C

Biología Aplicada 1999;16:113-115

RESUMEN

Se desarrolló un ELISA indirecto utilizando un doble recubrimiento con poli-L-lisina y el polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C (Instituto "Finlay", Habana, Cuba) para evaluar la respuesta inmune contra este componente de la vacuna cubana VA-MENGOC-BC®. Como conjugado, se utilizó anti-IgG humana/fosfatasa alcalina el cual se une a los anticuerpos anti-polisacáridos C producidos en humanos, reacción evidenciada por la degradación del sustrato específico (p-nitrofenilfosfato). La detectabilidad del ensayo fue de 367 U/mL. La imprecisión (intraensayo, interensayo y total), así como las desviaciones de la recuperación, linealidad y paralelismo, fueron inferiores a 10%. Se calculó la ecuación de regresión entre el estándar PB2 del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Estados Unidos y el del Instituto "Finlay", ($CDC = 0,5398 \text{ Finlay} + 143$), lo que permitió establecer una relación entre ellos.

Palabras claves: ELISA anti-polisacárido C, *Neisseria meningitidis*, polisacárido C

Introducción

Neisseria meningitidis es una causa importante de infección del sistema nervioso central que origina una alta mortalidad y morbilidad, provocadas fundamentalmente por cepas de los serogrupos A, B y C. Para prevenir esta enfermedad, se han desarrollado vacunas antimeningocócicas monovalentes, bivalentes y tetravalentes contra los serogrupos A, C, Y y W135. Estas vacunas han resultado ser inmunogénicas y tolerables en adultos, aunque en niños menores de dos años confieren una inmunidad de corta duración [1].

La vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC® contiene proteínas de la membrana externa de la cepa B4:P1.15 de *N. meningitidis*, embebidas en un proteoliposoma, y polisacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C de la cepa C11ATCC [2].

Junto con estas vacunas, surgen los métodos que permiten evaluar la respuesta inmune humoral contra estos preparados vacunales. Uno de los más empleados actualmente es el ELISA [3, 4].

En el presente trabajo se describe la normalización y validación de un ELISA de tipo indirecto para la cuantificación de anticuerpos anti-polisacárido C de *N. meningitidis* del isotipo IgG, en los sueros de humanos vacunados con VA-MENGOC-BC® u otros preparados vacunales que incluyan el serogrupo C. Se

determinaron las características del sistema y se calculó la ecuación de regresión entre el estándar del Instituto "Finlay" y el PB2 del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Estados Unidos [5].

Materiales y Métodos

Antígeno

El polisacárido C utilizado para el recubrimiento de la fase sólida fue suministrado por el Departamento de Control de Procesos del Instituto "Finlay", Habana, Cuba.

Preparación de la curva estándar

Para la selección del estándar se analizaron 84 sueros de humanos adultos vacunados con VA-MENGOC-BC®, de los cuales se seleccionó la bolsa de mayor título y se le asignó una concentración de 10 000 U/mL. La curva estándar se confeccionó con seis puntos obtenidos por diluciones 1:2 seriadas; el gráfico abarca el rango desde 10 000 hasta 312,5 U/mL.

Suero control

El suero control se seleccionó del grupo de 84 sueros humanos de donantes vacunados analizados y se diluyó con albúmina de suero humano a 6% para que su concen-

1. Poolman JT. Development of a meningococcal vaccine. *Infect Agents Dis* 1995;4:13-28.

2. Sierra GV, Campa HC, Garcia IL, Sotolongo PF, Izquierdo PL, Valcarcel NM, et al. Efficacy evaluation of the Cuban vaccine VA-MENGOC-BC® against group B *Neisseria meningitidis* caused disease. In: Achtman M, Kohl P, Marchal C, Morelli G, Seiler A, Thiesen B, editors. *Proceedings of the 7th International Pathogenic Neisseria Conference*; Berlin, Germany, 1990. p.129-34.

3. Lieberman JM, Chiu SS, Wong VK, Partridge S, Chang SJ, Chiu CY, et al. Safety and immunogenicity of a serogroups A/C *Neisseria meningitidis* oligosaccharide-protein conjugate vaccine in young children. *JAMA* 1996;275:1499-503.

4. Mitchell LA, Ochnio JJ, Glover C, Lee AY, Ho MKL, Bell A. Analysis of meningococcal serogroup C specific antibody levels in British Columbian children and adolescents. *J Infect Dis* 1996;173:1009-13.

5. Gheesling LL, Carlone GM, Pais LB, Holder PF, Maslanka SE, Plikaytis BD, et al. Multicenter comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup C anti-polysaccharide antibody levels measured by standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1994;32:1475-82.

tracción se encontrara entre el tercero y cuarto punto de la curva estándar. Para la determinación del rango de aceptación del suero de control, se realizaron 446 repeticiones de la muestra y se definió como el valor promedio \pm 2 desviaciones estándar (DE) [6]. La comprobación de la normalidad se realizó mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov ($\alpha = 0,05$). Todos los cálculos estadísticos fueron realizados en Statgraphics® Plus para Windows [7].

Muestras

Las muestras se ensayaron en una dilución 1:200 en solución diluyente para muestras, estándar y control, la cual está formada por solución salina tamponada con fosfato 0,15 M pH 7,2 - 7,4 (SSTF), 0,05% de Tween 20 y leche descremada a 3% (Merck) (solución A). Se hicieron diluciones mayores en aquellos casos con valores de DO superiores al del primer punto de la curva estándar, y en las pruebas de dilución.

Ensayo inmunoenzimático

Para la cuantificación de IgG anti-polisacárido C se diseñó un sistema ELISA de tipo indirecto, en el cual se utilizaron placas de poliestireno de alta capacidad de acoplamiento (Costar 3590, Estados Unidos). Para el recubrimiento de la fase sólida, se utilizó una solución de poli-L-lisina de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en SSTF (solución B) de la cual se adicionan 100 μL por pocillo y la placa con esta solución se incubó a 20-25 °C por 30 min en una cámara húmeda. Se realizaron tres lavados con solución B a intervalos de 30 s. Se adicionaron 100 μL por pocillo de una solución de polisacárido C a una concentración de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluidos en solución B. La placa se incubó de 16 a 20 h a 4 °C en una cámara húmeda. Luego, la placa se lavó tres veces con SSTF + Tween 20 a 0,05% (solución C) a intervalos de 30 s; se adicionaron las muestras en estudio, el estándar y el control del ensayo, diluidos en solución A y fueron incubados 1 h a 37 °C en una cámara húmeda. Se realizaron tres lavados con solución C y se añadieron 100 μL por pocillo de un conjugado anti-IgG humana/fosfatasa alcalina (SIGMA). La reacción se incubó durante 1 h a 37 °C en una cámara húmeda. Finalmente, se realizaron tres lavados con solución C y se añadió el sustrato *p*-nitrofenilfosfato (SIGMA) a una concentración de 1 mg/mL en solución reguladora dietanolamina a 0,92 M pH 9,8, y se incubó durante 30 min en la oscuridad, período en el que el primer punto de la curva estándar debe alcanzar una DO de 1,2 a 1,3. Al cabo de este tiempo, la reacción se detiene con 100 mL por pocillo de NaOH 3 M y se realiza la lectura a 405 nm en un lector de MicroELISA Anthos Labtec.

La cuantificación se realizó mediante un programa aportado por el CDC de Atlanta, Estados Unidos que utiliza una transformación logístico-log con cuatro parámetros [8].

Parámetros de calidad del ensayo

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

- **Concentración mínima detectable.** Se realizaron 80 repeticiones del reactivo blanco (solución A) y se calculó el promedio + 2 DE [6, 9].
- **Precisión del sistema.** La variación intraensayo fue comprobada ensayando cinco sueros de concentraciones que estuvieran en el rango de la curva patrón, mediante la realización de diez repeticio-

nes de cada muestra en tres placas diferentes. La variación interensayo utilizó la información de dos placas diarias durante tres días, comparando las medias de cada placa. Para la variación total, se emplearon todos los valores. El coeficiente de variación (CV) se usó para estimar la variación estadística de la media entre las réplicas [5, 6, 9].

- **Exactitud.** Se analizó el recobrado seleccionándose, para ello, una muestra libre de anticuerpos contra el polisacárido C, a la que se le añadieron diferentes volúmenes de cinco muestras de sueros de concentración conocida [6]. El recobrado se analizó por medio de la fórmula (media del valor medido / valor teórico de concentración) x 100. El valor teórico se representa por (concentración calculada x volumen de la muestra evaluada) / (volumen de la muestra evaluada + volumen de la muestra libre de anticuerpos).
- **Evaluación de la curva estándar.**

Paralelismo

Se analizaron cinco muestras de sueros en diluciones seriadas 1:800, 1:1 600 y 1:3 200, y sus valores de concentración se miden previa corrección con el factor de dilución. Se calculó la media, la DE y el CV entre las réplicas para cada muestra [6, 9].

Linealidad

Se prepararon cinco pares de muestras, mezclando en cada caso dos muestras con concentraciones elevadas y bajas. El valor teórico se comparó con el obtenido [6, 9].

Comparación del estándar "Finlay" con el PB2 del CDC de Atlanta

Se realizaron diluciones a la mitad seriadas de 1:100 hasta 1:3 200 para ambos estándares, se calculó la media entre las réplicas de cada dilución ($n = 200$) y se determinó la ecuación de regresión, así como el coeficiente de determinación previa verificación de la homogeneidad de las varianzas para cada punto de la curva mediante la prueba de Cochran.

Resultados y Discusión

Se preparó una curva estándar de seis puntos a partir de una dilución 1:100 hasta 1:3 200. El rango de la curva permitió cuantificar entre 20 000 y 625 U/mL con la dilución de trabajo 1:200. A esta dilución, los valores de concentración de IgG anti-polisacárido C de la mayoría de las muestras estudiadas con este sistema, se encuentran dentro del rango de valores de la curva estándar, lo que nos permite confirmar la utilidad de la dilución de trabajo seleccionada.

El límite de detección calculado fue de 367 U/mL, valor inferior al límite de la curva para una dilución 1:200 de la muestra, pero incluido dentro del rango de la curva para las muestras con el mismo factor de dilución (1:100) que la dilución inicial de la curva estándar.

El suero control mostró una distribución normal y se ubicó entre el tercero y el cuarto punto de la curva, según la dilución de trabajo con un rango entre 2 394 y 4 978 U/mL (Figura 1).

Este rango permite controlar la calidad de la preparación de la curva estándar, ya que los ensayos sólo deben ser aceptados cuando el suero control muestre valores de concentración dentro del mismo.

6. 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.

7. Statgraphics® Plus for Windows [computer program]. Version 1.0. Statistical Graphics Corp, USA, 1994.

8. 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; 29:1439-46.

9. Broughton PMG, Bergenzi C, Lindstedt G, Loeber IG, Malan PG, Mathieu M, et al. Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use. Part 1. Quantitative tests. European Committee for Clinical Laboratory Standards, 1986;3:3.

10. 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.

11. 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;5:10-4.

12. Westerink MAJ, Metzger DW, Hutchins WA, Adkins AR, Holder PF, Pais LB, et al. Primary human immune response to *Neisseria meningitidis* serogroup C in interleukin-12-treated severe combined immunodeficient mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes. J Infect Dis 1997;175:84-90.

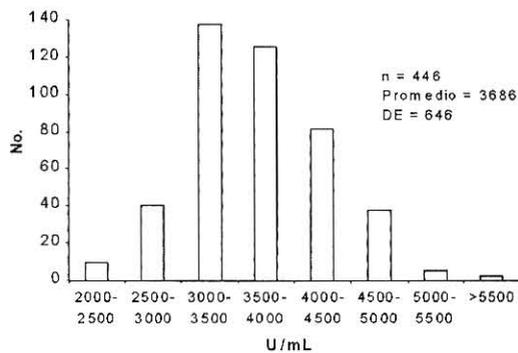


Figura 1. Rango del suero control del ELISA anti-polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C.

Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo no sobrepasaron el 10% como se recomienda para este tipo de técnica (Tablas 1 y 2).

Otros trabajos reportan coeficientes de variación de 1 a 19% que indican una menor precisión en la técnica realizada [10].

Estos resultados garantizan una adecuada precisión en la determinación de la concentración de las muestras en las diferentes zonas de la curva estándar.

La prueba de paralelismo de las muestras ensayadas, mostró independencia del valor de 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 a 10% (Tabla 3).

El análisis de la linealidad mostró que los valores observados se encontraban dentro del intervalo de $\pm 10\%$ con respecto al valor esperado (Tabla 4).

Este resultado garantiza una adecuada linealidad de la curva estándar y se corresponde con los reportados por otros autores para sistemas ELISA [11], que posibilita confiar en estudios posteriores con esta técnica *in vitro*.

El recobrado del sistema para cinco muestras diferentes se ubicó entre 91 y 108% y el valor promedio del recobrado fue 101,51%, lo que nos permite afirmar la alta exactitud obtenida al encontrarse todos los valores en el intervalo comprendido entre $\pm 10\%$ del valor esperado (Tabla 5) [6, 9].

No existen patrones internacionales como referencia para cuantificar anticuerpos anti-polisacáridos C. En el CDC de Atlanta, Estados Unidos, se confeccionó un estándar codificado como PB2, al cual se le asignó arbitrariamente 2 800 U [5]. El CDC es una institución que desempeña un papel rector en la evaluación de la respuesta inmune a vacunas, por lo que es imprescindible relacionar el estándar "Finlay" con el del CDC, teniendo en cuenta que ambos se confeccionaron en un mismo período y existen trabajos en los cuales se usan uno u otro de estos estándares [12]. Una vez verificado que las varianzas entre cada punto son homogéneas (prueba de Cochran), se calculó la ecuación de regresión que fue $CDC = 0,5398 \text{ Finlay} + 143$ (Figura 2), lo que permite comparar diferentes estudios independientemente del estándar empleado.

La alta precisión y exactitud de este ELISA lo hacen adecuado para evaluar la respuesta anti-IgG contra el polisacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C, componente de VA-MENGOC-BC®.

Tabla 1. Precisión intraensayo.

Muestras (n=10)	Placa 1		Placa 2		Placa 3	
	X (U/mL)	CV (%)	X (U/mL)	CV (%)	X (U/mL)	CV (%)
1	7 918	5,05	7 179	6,75	7 264	8,08
2	3 452	4,62	4 251	7,01	4 415	4,57
3	2 005	6,74	2 029	5,76	2 341	7,59
4	1 021	5,18	1 089	4,88	1 077	3,71
5	515	6,18	478	8,25	529	6,57

X: promedio; CV: coeficiente de variación

Tabla 2. Precisión interensayo y total.

Muestras	Interensayo (n = 6)			Total (n = 60)		
	X (U/mL)	DE (U/mL)	CV (%)	X (U/mL)	DE (U/mL)	CV (%)
1	7 453	404	5,42	7 453	584	7,83
2	4 040	515	12,74	4 040	481	11,90
3	2 125	188	8,84	2 125	208	9,78
4	1 062	36	3,38	1 062	56	5,27
5	507	26	5,12	507	40	7,88

X: promedio; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

Tabla 3. Prueba de paralelismo.

Dilución	Muestra 1 (U/mL)	Muestra 2 (U/mL)	Muestra 3 (U/mL)	Muestra 4 (U/mL)	Muestra 5 (U/mL)
800	6 877	22 255	34 595	4 307	9 853,0
1600	6 751	26 680	32 675	4 229	11 102,0
3200	6 959	24 269	35 273	4 068	9 401,0
X	6 862	24 401	34 181	4 201	10 119,0
DE	85,4	1 809	1 100,5	99,4	719,2
CV %	1,2	7,4	3,2	2,4	7,1

X: promedio; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

Tabla 4. Estudios de linealidad.

Muestra X (U/mL)	Muestra Y (U/mL)	Muestra X+Y (U/mL)	Valor esperado (U/mL)	Por ciento
7 450	13 106	10 691	10 278	104,0
4 345	15 779	93 79	10 062	93,2
2 450	9 065	5 886	5 758	102,2
3 770	15 869	9 719	9 820	99,0
5 610	24 356	16 327	14 983	109,0

Tabla 5. Ensayo de recuperación.

Muestra n=10	Observado (U/mL)	Esperado (U/mL)	Recuperación (%)
1	7 453	8 103	91,97
2	4 040	3 925	102,92
3	2 125	1 963	108,25
4	1 062	981	108,25
5	405	421	96,19

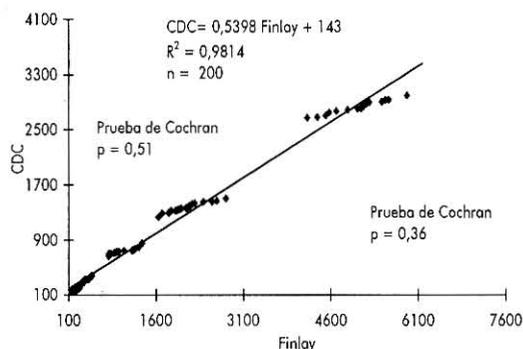


Figura 2. Ecuación de regresión entre unidades "Finlay" y unidades CDC para IgG anti-polisacárido C.