

Utilización de placas de ELISA de alta y de baja avidéz en la determinación de anticuerpos contra la toxina de cólera

Elizabeth Castañeda¹, Magaly Chinchilla¹, David A. Sack², Ann Mari Svernerholm³

Resumen

Los sueros de un estudio de inmunogenicidad de una vacuna oral de células enteras de *Vibrio cholerae* O1 más la subunidad B recombinante de la toxina (CE/sBr) fueron procesados para la determinación de anticuerpos antitoxina de cólera en placas de ELISA de alta y de baja avidéz. Los títulos de anticuerpos antitoxina, de la clase IgG, de los sueros prevacunales estuvieron incrementados de 5 a 7 veces, en las placas de alta avidéz, comparados con los títulos obtenidos en las placas de baja avidéz. Igualmente, los títulos de los sueros post vacunales fueron 3 veces superiores cuando se realizó la misma comparación de placas. Por consiguiente, la tasa de seroconversión medida en las placas de alta avidéz fue de 39%, comparada con 68% al utilizar las placas de baja avidéz. El suero control de alto título de anticuerpos no detectó el problema. Se sugiere utilizar placas de baja avidéz al determinar anticuerpos contra la toxina de cólera por la técnica de ELISA.

The use of low and high binding ELISA plates in the determination of cholera antitoxin antibodies

Sera from an immunogenicity study of killed oral cholera vaccine was tested in high and low binding Elisa plates. High binding plates yielded 5 to 7-fold higher pre-vaccination IgG antitoxin titres and about 3-fold higher post-vaccine antitoxin titres, but lower sero-conversion rates (39% for high and 68% for low binding plates) when they were compared with low binding plates, because the pre-vaccine titres were relatively higher than the post-vaccine titres. The high titre serum, being used as a standard control serum in each ELISA plate, did not detect the problem. We suggest using low-binding plates when carrying out ELISA assays for cholera antitoxin antibodies.

Durante la realización de un ensayo clínico de inmunogenicidad de la vacuna oral de células enteras de *Vibrio cholerae* O1 más la subunidad B recombinante de la toxina (CE/sBr) realizado en Barranquilla (1, 2), se observó que el porcentaje de seroconversión de los títulos antitoxina fue más bajo que el informado en otros estudios con la misma vacuna (3-7). La posible explica-

ción para la diferencia en la respuesta no parecía ser de carácter biológico; por tanto, con el fin de buscar una explicación técnica que aclarara la diferencia, se decidió reevaluar el método de ELISA empleado para determinar los títulos de anticuerpos antitoxina y dilucidar así las diferencias observadas.

Los reactivos y el método de ELISA que habían

¹ Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, Colombia,

² The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, Estados Unidos,

³ University of Goteborg, Goteborg, Suecia.

sido empleados fueron idénticos a los previamente informados (8), excepto por las características de avidéz de las placas de ELISA. Por tanto, se diseñó un estudio para determinar si las características de unión de las placas podrían afectar en forma significativa los títulos antitoxina y, por ende, la seroconversión, es decir, el incremento en el título de anticuerpos de los sueros posvacunales comparado con los prevacunales. Los resultados sugieren que, en las placas de alta avidéz, los títulos de anticuerpos antitoxina son mayores, tanto en los sueros pre y posvacuna, pero la diferencia fue más marcada con los sueros prevacuna. Por consiguiente, la proporción de sueros pareados con seroconversión fue menor en las placas de alta avidéz. Estas diferencias no fueron detectadas cuando se incluyó, en cada placa, un suero control con alto título ya que éste indicó que la prueba estaba dentro del límite de aceptación con las dos clases de placas.

Materiales y métodos

Muestras de suero. Se incluyeron las muestras de suero de dos grupos de voluntarios. El primer grupo incluyó 50 muestras pareadas de 28 personas que recibieron la vacuna y de 22 que recibieron el placebo en un estudio, doble ciego, controlado con placebo, de inmunogenicidad de la vacuna de CE/sBr realizado en Barranquilla (2). Las muestras de suero capilar fueron recolectadas antes de la primera dosis y 15 días después de la segunda dosis.

El segundo grupo de muestras de suero fueron recolectadas por punción venosa de 20 voluntarios de Bogotá que recibieron la misma vacuna en un estudio abierto donde no se incluyó el placebo. Las muestras de suero (5 por cada voluntario) fueron obtenidas semanalmente, a partir de la semana 0, día de la primera dosis hasta el día 28, dos semanas después del suministro de la segunda dosis (9).

Vacuna. La vacuna (SBL vaccinas A o B, Stockholm) consistió de 10^{11} células enteras muertas de *Vibrio cholerae* O1, más 1 mg de la subunidad B recombinante de la toxina (CE/SBr) y fue similar a la empleada en un estudio previo en Bangladesh (3), excepto que en esta

vacuna la subunidad B de la toxina fue obtenida a partir de una cepa de *Vibrio cholerae* que produce solo la subunidad B pero no la holotoxina (5). El placebo (SBL vaccines A, B, Stockholm) consistió de células muertas de *Escherichia coli* K12 ajustada a la misma densidad óptica que la vacuna (3). La vacuna fue dada por vía oral en una solución de bicarbonato y ácido cítrico (Samarín), el volumen de la solución fue adaptado según la edad de los participantes (2, 9).

Microplacas. Se emplearon microplacas de 96 pozos, de fondo plano, de las siguientes especificaciones: placas de alta avidéz, Immulon 2 (Dynatech) y Corning; así mismo, placas de baja avidéz, Immulon 1 (Dynatech).

Método de ELISA. Los títulos de antitoxina de IgG e IgA fueron determinados por un micrométodo (8). Brevemente, las microplacas fueron cubiertas con 100 μ L del gangliósido Gm1 (galactosa β 1 \rightarrow 3N- acetil glucosamina β 1 (ácido 3 N-acetil neuramínico α 2 \rightarrow 3) \rightarrow glucosa - ceramida) (0,3nmol/mL, Sigma), diluido en solución tampón fosfato salino (PBS), incubadas toda la noche y almacenadas a 4°C, por un máximo de dos semanas. Al momento del uso fueron lavadas 3 veces con PBS, bloqueadas con 150 μ L de albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% en PBS e incubadas a 37°C por 30 minutos y lavadas una vez más con PBS. Posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 100 μ L de la subunidad B de la toxina de cólera (Universidad de Goteborg, Suecia) (0,5 μ g/mL) diluida en BSA-PBS y se incubaron las placas durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces con Tween 20 al 0,05% en PBS, se adicionaron las muestras de suero diluidas en BSA-PBS-Tween, en un volumen final de 100 μ L por pozo (la dilución inicial fue 1:60 y la dilución final 1:131.220, con un volumen final de 100 μ L por pozo), se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente 3 veces con PBS-Tween y se adicionaron, por pozo, 100 μ L de anti-IgG o anti-IgA humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson), diluidos en 0,1% de BSA-PBS-Tween. Finalmente, las placas se lavaron con PBS-Tween y se adicionó el substrato

compuesto de o-fenilendiamina (OPD) (1mg/mL) (Sigma) diluido en solución de citrato de sodio, pH 4,5 más peróxido de hidrógeno al 30% (4µL/10mL). A los 20 minutos, las placas fueron leídas en un lector de ELISA, a una densidad óptica (DO) de 450 nm. Los títulos se calcularon con un programa de computador para interpolar la dilución del suero que daba una OD de 0,4 por encima de la línea base. Los sueros pre- y posvacuna fueron probados simultáneamente en la misma microplaca. A la lectura de DO de cada pozo se le restó la DO del pozo del blanco, al cual se agregó los mismos reactivos que a los pozos de las muestras problemas excepto la muestra de suero. Se empleó como control positivo, un suero con un título de anticuerpos antitoxina de 1:4.000.

La seroconversión se definió como el incremento en el título, mayor o igual a 1,5 veces, entre los dos sueros; este dato fue previamente estandarizado (3).

Resultados

La media geométrica (MGT) de los títulos de anticuerpos antitoxina, de la clase IgG en voluntarios de los grupos 1 (n=28) y grupo 2 (n=20) que recibieron la vacuna oral anti-cólera CE/sBr está expresada en el cuadro 1, en relación con la avidéz de las placas de ELISA empleadas.

La MGT de los sueros fue más alta en las placas de alta avidéz, comparada con la obtenida

en las placas de baja avidéz (cuadro 1); sin embargo, el incremento en la MGT fue menor, en las placas de alta avidéz comparado con las de baja avidéz en los dos grupos estudiados (cuadro 1). La relación de los títulos (placas de alta avidéz a placas de baja) fue mayor para los sueros prevacuna que para los sueros posvacuna (cuadro 1).

En la cuadro 2 se expresan las tasas de seroconversión de los títulos de anticuerpos antitoxina de las clases IgG e IgA en los dos tipos de placas. Para los dos grupos de sueros, la tasa de seroconversión fue significativamente más alta cuando se utilizaron las placas de baja avidéz.

La cuadro 3 muestra los títulos de IgG y de IgA de muestras seriadas de dos voluntarios del grupo 2, incluidos en los análisis de las tablas 1 y 2, los cuales recibieron dos dosis de vacuna. Nuevamente, el incremento en los títulos fue consistentemente mayor cuando se realizaron los ensayos con las placas de baja avidéz.

En general, existió una buena correlación entre las placas de alta y baja avidéz ($r = 0,86$ (0,77-0,91)). Sin embargo, los sueros con títulos bajos (1:300) en las placas de baja avidéz, presentaron menor correlación ($r = 0,24$ (-0,071-0,51)) que los sueros con títulos altos ($r = 0,89$ (0,86-0,96)). Por tanto, se observó que los sueros con títulos bajos tienden a dar resultados altos en las placas de alta avidéz.

Cuadro 1. Media geométrica de los títulos de anticuerpos antitoxina de clase IgG en personas* que recibieron la vacuna oral anti-cólera CE/sBr en placas de ELISA de alta y baja avidéz.

	Placas de alta avidéz		Placas de baja avidéz		Tasa placas alta/baja avidéz	
	Pre-vacuna	Pos-vacuna	Prevacuna	Pos-vacuna	Pre-vacuna	Pos-vacuna
Grupo 1* n=28	537**	954	102	275	5,26	3,46
Error estándar	474-608	843-1081	95-109	281-319		
Incremento	1,77	2,7				
Grupo 2* n=20	524	660	76	219	6,89	3,01
Error estándar	457-602	452-966	67-111	178-268		
Incremento	1,25	2,88				

*El grupo 1 estaba constituido por muestras de suero del estudio de inmunogenicidad en Barranquilla y el grupo 2 por muestras de voluntarios de Bogotá.

**Los números son las medias geométricas de los títulos (MGT) y los límites inferiores y superiores del error estándar de la MGT.

Cuadro 2. Tasas de seroconversión* de títulos de anticuerpos antitoxina de las clases IgG y IgA en placas de ELISA de alta y baja avidéz **.

	Placebo		Vacuna	
	Placas de alta avidéz	Placas de baja avidéz	Placas de alta avidéz	Placas de baja avidéz
1. Incremento en los títulos IgG				
Grupo 1	6/22 (27%)	5/22 (23%)	11/28 (39%)	19/28 (68%)***
Grupo 2	NP	NP	11/20 (55%)	14/20 (70%)
2. Incremento en los títulos IgA				
Grupo 2	NP	NP	12/20 (60%)	16/20 (80%)

* La seroconversión se definió como un incremento mayor o igual a 1,5.

** Las placas de alta avidéz fueron Corning para el grupo 1 e Immulon 2 (Dynatech) para el grupo 2.

*** Al procesar las muestras en placas de baja avidéz, una alta proporción seroconvirtió en forma significativa. ($\chi^2=4,51$, $p=0,33$ prueba de Mantel Haentzel).

NP: no probados: el placebo no fue dado a voluntarios.

Discusión

Este estudio demostró que la tasa de seroconversión observada varió según la clase de placa de ELISA empleada, de alta o de baja avidéz. En estudios previos de anticuerpos anti-toxina colérica, los datos serológicos fueron obtenidos empleando las placas de baja avidéz (1, 3, 7, 10). Cuando se empezaron a distribuir las placas de alta avidéz, algunos laboratorios las empezaron a usar, asumiendo que con ellas se podría mejorar la técnica de ELISA. Infortunadamente, los resultados que se obtuvieron en este ensayo, con las dos placas, no son comparables. Las tasas de seroconversión fueron significativamente menores con las placas de alta avidéz, principalmente debido al alto título obtenido con los sueros prevacuna. Las diferencias observadas fueron aplicables a ambas determinaciones, tanto a los anticuerpos de la clase IgG como a los de IgA.

Las placas de baja avidéz, Immulon 1 (Dynatech), son recomendadas para la adsorción de anticuerpos y de compuestos que contienen lípidos en un ambiente hidrofóbico, como son glicolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas y, generalmente, exhiben baja unión no específica; por esta razón, presentan bajo ruido de fondo. Por el contrario, las placas Immulon 2 (Dynatech), están diseñadas para estimular la unión de proteínas; en un medio hidrofílico, estas placas proveen una excelente unión de antígenos altamente purificados y pueden ser usadas en ensayos de proteínas, péptidos y ácidos nucleicos (11).

Las placas de alta avidéz utilizan poliestireno que ha sido tratado para incrementar la unión de las proteínas y se han diseñado para incrementar la sensibilidad en los ensayos que detectan antígeno. Sin embargo, cuando se emplean en ensayos que detectan anticuerpos, como este estudio lo demostró, las placas de alta avidéz pueden incrementar la lectura de densidad óptica, dando títulos altos, con el agravante de que el incremento en la lectura puede ser proporcionalmente mayor en sueros pre-vacuna. Esta misma observación fue descrita en un estudio realizado por Shekarchi y colaboradores al determinar anticuerpos anti-*Toxoplasma*; al emplear diferentes clases de placas, de baja y alta avidéz, demostraron que esta última clase presenta un incremento de la lectura de DO comparada con las de baja avidéz o placas no tratadas (12).

El control de calidad empleado para validar el ensayo incluyó un suero control estándar en cada placa de ELISA. Sin embargo, este procedimiento no pudo detectar el problema observado en este estudio, porque el suero estándar tenía un título alto de anticuerpos y, por lo tanto, dio resultados similares en las dos clases de placas. Esta observación no permitió detectar el problema al inicio del estudio, el cual se hizo aparente cuando los resultados se compararon con los obtenidos en otros estudios. De ahí, la importancia de incluir en la prueba un suero control estándar con título medio de anticuerpos para detectar esta clase de problemas.

Cuadro 3. Medias geométricas de los títulos (rango de error estándar de la media) de anticuerpos antitoxina de cólera de las clases IgG y IgA en los voluntarios del grupo 2 que recibieron vacuna.

Días de colección de suero	Placas de alta avidéz	Incremento relativo con los sueros pre-vacuna	Placas de baja avidéz	Incremento relativo con los sueros pre-vacuna
IgG				
0	524 (457-602)		76 (67-86)	
7	646 (542-769)	1,2	85 (65-111)	1,1
14	708 (604-830)	1,3	155 (129-186)	2,0
21	871 (743-1021)	1,7	200 (163-245)	2,6
28	660 (452-966)	1,3	219 (178-268)	2,9
IgA				
0	56 (48-66)		20 (17-22)	
7	105 (85-129)	1,9	28 (21-37)	1,4
14	123 (98-155)	2,2	52 (39-70)	2,6
21	178 (141-224)	3,2	74 (56-98)	3,7
28	115 (83-158)	2,0	65 (51-81)	3,2

La vacuna fue dada en los días 0 y 14.

Con este estudio se podría plantear que las placas de ELISA de baja avidéz permiten detectar un mayor número de individuos con anticuerpos contra la toxina de cólera; por tanto, es lógico su uso para poder comparar los resultados con los obtenidos en estudios previos. Una explicación para los resultados puede ser que las placas de alta avidéz sean más sensibles para detectar los anticuerpos de baja avidéz. Asumiendo que estos anticuerpos se presentan en sueros pre y posvacuna en iguales concentraciones y que la vacuna estimula la producción de anticuerpos protectores de mayor avidéz, la detección de los anticuerpos de baja avidéz producen un alto fondo que enmascara el desarrollo de los anticuerpos de mayor especificidad y avidéz. Por este hallazgo, sería prudente utilizar placas de baja avidéz e incluir sueros estándares con títulos bajos, medios y altos en las pruebas de detección de anticuerpos contra la toxina de cólera.

Agradecimientos

El estudio fue apoyado por la Organización Panamericana de la Salud y la vacuna fue donada por el *National Bacteriology Laboratory*, Stockholm, Sweden. A Kerstin Andersson de la Universidad de Göteborg por el valioso entrenamiento al personal del Instituto Nacional de Sa-

lud en la estandarización de los ensayos serológicos.

A los doctores Alberto Concha, Ministerio de Salud; Alejandro Giraldo, Fundación Gillow, y Fernando de la Hoz del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

Referencias

1. Clemens JD, Jertborn M, Sack DA, Stanton BF, Holmgren J, Khan MR, *et al.* Effect of neutralization of gastric acid on immune response to an oral B subunit, killed whole cell cholera vaccine. *J Infect Dis* 1986;154:175-8.
2. Concha A, Giraldo A, Castañeda E, Martínez M, de la Hoz F, Rivas F *et al.* Safety and immunogenicity of oral whole cell recombinant B subunit cholera vaccine in Barranquilla, Colombia. *Bull Pan Am Health Org* 1995;29:312-21.
3. Clemens JD, Sack DA, Harris JR, Chakraborty J, Khan MR, Stanton BF, *et al.* Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh. *Lancet* 1986;2:124-7.
4. Clemens JD, Stanton BF, Chakraborty J, Sack DA, Khan MR, Ahmed F *et al.* B subunit-whole cell and whole cell only oral vaccines against cholera: studies on reactogenicity and immunogenicity. *J Infect Dis* 1987;155:79-85.
5. Holmgren J, Svennerholm AM, Jertborn M, Clemens JD, Sack DA, Salenstedt R, *et al.* An

- oral B subunit: whole cell vaccine against cholera. *Vaccine* 1992;10:911-4.
6. **Jertborn M, Svennerholm AM, Holmgren J.** Safety and immunogenicity of an oral recombinant cholera B subunit-whole cell vaccine in Swedish volunteers. *Vaccine* 1992;10:130-2.
 7. **Jertborn M, Svennerholm AM, Holmgren J.** Immunological memory after immunization with oral cholera B subunit-whole-cell in Swedish volunteers. *Vaccine* 1994;12:1078-82.
 8. **Svennerholm AM, Jertborn M, Gothefors L, Karim AMMM, Sack DA, Holmgren J.** Comparison of mucosal antitoxic and antibacterial immune responses after clinical and after oral immunization with combined B subunit-whole cell vaccine. *J Infect Dis* 1984;149:883-93.
 9. **Castañeda E, Chinchilla M, Velandia M, de la Hoz F.** Seguridad e inmunogenicidad de la vacuna oral contra el cólera: estudio en 20 voluntarios. *Biomédica* 1995;15:54-8.
 10. **Migasena S, Desakorn V, Suntharasamai P, Pitisuttitham P, Prayurahong B, Supanaranond W, et al.** Immunogenicity of two formulations of oral cholera vaccine comprised of killed whole cell *Vibrios* and the B subunit of cholera toxin. *Infect Immun* 1989;57:117-20.
 11. **Kenny GE, Dunsmoor CL.** Principles, problems, and strategies in the use of antigenic mixtures for the enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1983;17:655-65.
 12. **Sherarchi IC, Sever JL, Lee YJ, Castellano G, Madden DL.** Evaluation of various plastic microtiter plates with measles, *Toxoplasma*, and gamma globulin antigens in enzyme-linked immunoabsorbent assays. *J Clin Microbiol* 1984;19:89-96.