

**BASES METODOLÓGICAS PARA
LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS EN
ENSAYOS CLÍNICOS DE VACUNAS
MEDIANTE TÉCNICAS
INMUNOENZIMÁTICAS**

Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze



Ciudad de La Habana, 2008

Edición al cuidado de: Lic. Orlando Gutiérrez López
Redacción y corrección: Lic. Virginia Betancourt López
Diseño de Cubierta: Lic. Roberto Chávez Miranda

Primera edición, 2004 (versión electrónica)
Segunda edición ampliada, 2008 (versión impresa y electrónica)

© Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze
© Sobre la presente edición:
Finlay Ediciones, 2008

ISBN: 978-959-7076-19-3

FINLAY EDICIONES
Ave. 212 No. 3112 e/ 31 y 37,
La Coronela, La Lisa,
Ciudad de La Habana, Cuba
Web: www.finlay.sld.cu/ediciones.htm

**A mi esposa, a nuestros padres
y muy especialmente a mi hijo**

Agradecimientos

Quisiera agradecer al Dr. C. Gustavo Sierra González, al Dr. Cs. Arturo Talavera Coronel y al Licenciado Orlando Gutiérrez López por sus oportunas sugerencias, a la Licenciada Virginia Betancourt López en la conducción del proceso de redacción y corrección y al Dr. Jorge Menéndez Hernández por el apoyo brindado para la publicación de este libro.

Contenido

PRÓLOGO

CAPÍTULO 1

Respuesta inmune contra inmunógenos vacunales / 1-11

CAPÍTULO 2

Métodos para la evaluación de anticuerpos inducidos por vacunas /
12-30

CAPÍTULO 3

Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos
de vacunas / 31-45

CAPÍTULO 4

Validación de los inmunoensayos empleados para evaluar la
inmunogenicidad de vacunas / 46-67

CAPÍTULO 5

Evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas preventivas /
68-82

Prólogo

Puede considerarse que el nacimiento de la Inmunología como ciencia data de 1798, a partir de la exitosa vacunación contra la viruela llevada a cabo por Edward Jenner. Algo más de doscientos años después la vacunología ha experimentado avances extraordinarios.

La importancia de la vacunación radica en el hecho de la drástica reducción en la morbimortalidad de numerosas enfermedades prevenibles por vacunas, si bien es cierto que queda mucho por hacer en los países en desarrollo, entre los cuales Cuba constituye una excepción. Nuestro país ha logrado eliminar el tétanos neonatal, la difteria y la poliomielitis; la incidencia de otras enfermedades ha disminuido, como la tos ferina, la enfermedad meningocócica, el sarampión, la papera, la rubéola, la hepatitis B y las afecciones producidas por *Haemophilus influenzae*.

En los últimos años han ocurrido avances extraordinarios en la biología molecular, lo que junto al uso de nuevos adyuvantes y tecnologías que podrán simplificar la inmunización, permitirán mejorar el funcionamiento de las vacunas existentes y crear otras.

El objetivo primario de la vacunación es inducir una respuesta inmune protectora. Clásicamente esta respuesta se ha dividido en inmunidad humoral y celular, aunque esta separación es completamente arbitraria, lo que se hace más evidente en la respuesta contra inmunógenos timodependientes.

Aunque es importante el predominio de una fuerte respuesta celular en algunas vacunas, como pudiera ser contra el *Mycobacterium tuberculosis* y el virus de la inmunodeficiencia humana, en la mayor parte de las vacunas actuales es deseable estimular la producción de anticuerpos con capacidad neutralizante, fijadora de complemento, opsonizante, o antiadhesina, no sólo para la protección contra microorganismos extracelulares, también en el caso de virus u otros gérmenes intracelulares en los que se desee impedir el acceso a sus células “diana”.

La respuesta inmune inducida por vacunas puede ser medida por técnicas *in vivo* e *in vitro*. Las primeras miden directamente la actividad biológica de los efectores de la respuesta inmune en animales de laboratorio, son sensibles y miden realmente la capacidad funcional de estos efectores, pero son

engorrosas. Las pruebas *in vitro* funcionales o biológicas habitualmente se correlacionan con la protección; estos métodos, aunque en menor grado, también son laboriosos. Los ensayos *in vitro* no funcionales son simples, rápidos y adecuados para procesar un gran número de muestras, y son muy útiles para evaluar la inmunogenicidad de una vacuna o candidato vacunal.

En los casos en que puedan concordar con ensayos funcionales resulta una herramienta muy adecuada. Dentro de éstos, los inmunoensayos enzimáticos, sensibles, específicos y de elevada precisión y exactitud, son los de elección para determinar el grado de protección o la seroconversión inducida por una vacuna.

Con la presente obra se pretende abordar, de forma sucinta, los principales aspectos relacionados con el desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas, como una modesta contribución al progreso que en este campo ha alcanzado la Biotecnología cubana.

Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze

Capítulo 1

Respuesta inmune contra inmunógenos vacunales

Vacunas

La prevención de las enfermedades mediante inmunización precede al conocimiento de la infección y a la inmunología en la historia del hombre. De uno a dos siglos antes de Cristo se practicaba en la India y en la China la inoculación intradérmica del contenido de las lesiones de viruela (variolización), o la aspiración de polvo de costra de las lesiones de viruela con el fin de inducir una infección de poca letalidad que previniera esta enfermedad, de elevada mortalidad y que dejaba graves cicatrices en los sobrevivientes. Esta práctica se extendió por Asia y África gracias a las conquistas islámicas. En 1721 se inicia la variolización en Europa, cuando la esposa del embajador inglés Lady Mary Wotley Montagu trajo esta práctica desde Turquía.

La primera inmunización efectiva, aunque todavía empírica, fue llevada a cabo por el médico inglés Edward Jenner (1749-1823), quien observó que las personas que se curaban después de alguna infección con la viruela de la vaca (*vaccinia*) quedaban protegidas contra la viruela del hombre. Jenner introdujo la práctica de inocular el contenido de las lesiones vesiculares de la *vaccinia* para proteger contra la viruela humana, y hace la primera inoculación efectiva al niño James Phipps en 1796. Al material usado lo denominó “vaccine” (vacuna) y al proceso “vaccination” (vacunación) que fue introducido para reemplazar el término variolización.

En fecha tan temprana como 1804, el sabio cubano Tomás Romay introdujo la vacunación en Cuba. Él y su familia fueron los primeros inmunizados en nuestro país.

El enfoque científico, tal y como lo conocemos hoy día, no fue aplicado hasta casi un siglo después, a partir de los trabajos de Louis Pasteur (1822-1895) y sus colaboradores. Ellos investigaron la posibilidad de proteger contra la infección, en el hombre y los animales, mediante vacunaciones con cepas atenuadas de microorganismos.

Dr. Rolando Ochoa Azze

El siglo XX pasará a la historia, entre otras cosas, por el gran impulso desarrollado en el campo de la vacunología. En 1901 existían pocas vacunas capaces de prevenir las enfermedades infecciosas. A finales de siglo, ya existían vacunas para al menos veintiuna enfermedades, entre ellas la primera y única vacuna licenciada contra el meningococo B, VA-MENGOC-BC[®], producida por el Instituto Finlay, Centro de Investigación de Cuba.

El siglo XXI es promisorio, se espera que la secuenciación genética conduzca a una nueva generación de vacunas, de manera similar a lo que aportaron en su momento las entonces novedosas técnicas de cultivo de tejidos, base de las vacunas de los años 50, y la tecnología del ADN recombinante, que permitió acceder a las vacunas obtenidas por ingeniería genética a finales de los 80. En pocos años se ha descrito la secuencia genética de más de trece microorganismos y se trabaja en otros sesenta proyectos. Se prevén avances notables tanto en la combinación de vacunas como en los métodos de distribución, tales como vacunas en plantas transgénicas, parches de piel transcutánea y vacunas nasales.

No seremos solamente testigos de una era de nuevas tecnologías, sino del cambio de paradigma al que hemos limitado a las vacunas, que se diseñarán no solamente para la prevención de enfermedades infecciosas, sino dirigidas a la prevención o al tratamiento de enfermedades autoinmunes, neoplasias y otras enfermedades crónicas. Por ello preferimos definir como vacuna al preparado biológico que se inyecta en un organismo con el fin de lograr un estado de inmunidad contra una determinada infección o enfermedad.

Respuesta inmune contra inmunógenos vacunales

El propósito de la vacunación es inducir inmunidad que prevenga la invasión por microorganismos, los elimine si logran entrar al hospedero y neutralice sus toxinas.

La inmunización da por resultado la producción de anticuerpos dirigidos contra el agente infectante o sus productos tóxicos, también puede iniciar las respuestas celulares mediadas por linfocitos y macrófagos. Los anticuerpos protectores incluyen los que inactivan los productos tóxicos solubles, facilitan la fagocitosis y la digestión intracelular de los microorganismos (opsoninas), fijan el complemento sérico para dañar cápsulas y membranas (lisinas), previenen la adhesión a las superficies mucosas (antiadhesinas) y la proliferación de los gérmenes infectantes (anticuerpos neutralizantes).

Los anticuerpos reaccionan con los antígenos en la sangre, otros líquidos corporales y superficies mucosas, pero no pueden alcanzar los sitios intracelulares como sucede con la replicación viral. Sin embargo, son eficaces contra muchas enfermedades virales, porque evitan la penetración celular y previenen que la replicación local se disemine hasta el órgano blanco, como sucede en el caso del poliovirus. Los linfocitos citotóxicos son vitales en la eliminación de las células infectadas.

La inmunidad humoral es la principal respuesta protectora contra microorganismos extracelulares. Algunos de los componentes más inmunogénicos de las paredes celulares de las bacterias y de sus cápsulas son polisacáridos, los cuales son prototipos de inmunógenos timoindependientes. Estos inmunógenos estimulan directamente las células B y dan lugar a una respuesta IgM, se producen además otros isotipos de inmunoglobulinas, probablemente como resultado de la liberación de citocinas que promueven el cambio entre isotipos de cadenas pesadas. Un ejemplo de esto es la respuesta contra los polisacáridos capsulares de neumococo y meningococo, que está predominantemente caracterizada por la producción de anticuerpos IgG₂.

Para los inmunógenos vacunales timodependientes, es característica la respuesta de células T cooperadoras CD4⁺, estimuladas por antígenos peptídicos en asociación con moléculas del sistema o complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, previa endocitosis del inmunógeno y su procesamiento por las células presentadoras de antígenos (CPAs). Las CPAs más definidas son las células dendríticas, los linfocitos B, fagocitos mononucleares y células endoteliales.

La presentación antigénica de las células B a las células T-CD4⁺ y la liberación de citocinas, estimulan varios mecanismos efectores (Figura 1.1):

1. Producción de anticuerpos de clase IgG, isotipo característico de la respuesta secundaria, que opsonizan las bacterias y favorecen la fagocitosis, mediante su unión a los receptores Fc- γ de los monocitos, macrófagos y neutrófilos.
2. Anticuerpos IgM, en la respuesta primaria, e IgG, que neutralizan las toxinas bacterianas y evitan su unión a las células diana o blanco.
3. Los anticuerpos IgA, presentes en varias secreciones (tractos gastrointestinal y respiratorio) son muy importantes para neutralizar las toxinas bacterianas y prevenir la colonización en órganos extraluminales.

La IgA tiene poca importancia en la inmunidad humoral sistémica, pero desempeña un papel clave en la inmunidad de mucosa, debido a que puede ser selectivamente transportada a través de las mucosas, donde es capaz de neutralizar diferentes gérmenes y toxinas e inhibir la adhesión.

4. Anticuerpos IgM e IgG, que activan el complemento y llevan a la producción del complejo de ataque a la membrana (CAM), de acción microbicida y a la liberación de productos que son mediadores en la inflamación aguda (C3a, C4a, C5a) y de opsoninas (C3b, iC3b, C4b) que se unen a los receptores tipos 1 y 3, promoviendo la fagocitosis. La función lítica del CAM es más importante en algunas bacterias. Por ejemplo, las deficiencias en los últimos componentes del complemento, C5 al C8, están asociadas con una alta susceptibilidad a las infecciones por *Neisseria*, pero no a otras infecciones bacterianas.

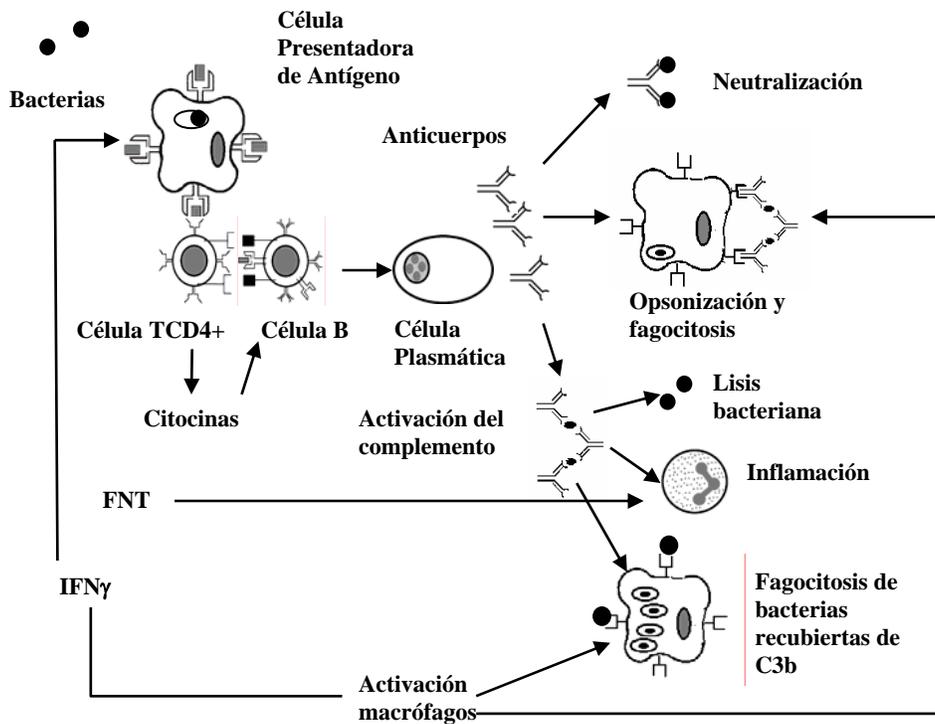


Figura 1.1. Respuesta inmune humoral contra inmunógenos timodependientes.

Por supuesto que en una vacuna es importante estimular una respuesta con memoria, de larga duración, a predominio de IgG, o IgA cuando se requiera una adecuada inmunidad de mucosa, de ahí que sea deseable el empleo de inmunógenos timodependientes, por lo que se usan proteínas portadoras en el caso de los polisacáridos para modificar la respuesta inmune.

La función efectora de los linfocitos T-CD4+ está mediada por citocinas que estimulan la secreción de anticuerpos, inducen inflamación local e incrementan la actividad fagocítica y microbicida de los macrófagos. El interferón- γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral (FNT) son las principales citocinas responsables de la activación de los macrófagos y el proceso inflamatorio. Otras citocinas son importantes para la secreción y el cambio de clase de anticuerpos.

Muchas bacterias y hongos, así como todos los virus, sobreviven y se replican dentro de las células del hospedero. Entre las bacterias más patogénicas se encuentran aquellas que resisten la degradación dentro de los macrófagos y son, por tanto, capaces de sobrevivir en su interior. Teniendo en cuenta que estos microorganismos han sido capaces de encontrar un nicho donde se hacen inaccesibles a los anticuerpos circulantes, su eliminación requiere de mecanismos inmunes bien diferentes a los utilizados contra bacterias extracelulares. La principal respuesta inmune protectora contra bacterias intracelulares es la inmunidad mediada por células, que consiste en dos tipos de reacciones:

1. Activación de los macrófagos por las citocinas producidas por las células T, sobre todo IFN- γ , con la consiguiente muerte de los microorganismos fagocitados.
2. Lisis de las células infectadas por los linfocitos T citolíticos CD8+.

Los inmunógenos vacunales dirigidos contra las bacterias intracelulares deben estimular los linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+. Los CD4+ responden a los antígenos peptídicos presentados por las células presentadoras en el contexto del CMH de clase II. Los linfocitos T cooperadores CD4+ se diferencian en el fenotipo T_{H1}, inducidos por la producción de IFN- γ por las células asesinas naturales (NK) y linfocitos T activados, así como por la producción de IL-12 por los macrófagos. Las células T_{H1} secretan IFN- γ , el cual activa a los macrófagos para que produzcan derivados reactivos de oxígeno y enzimas que maten a las bacterias fagocitadas. El IFN- γ estimula también el cambio de isotipo de anticuerpos que activan el complemento y

opsonizan las bacterias para la fagocitosis, de modo que ayuda a las funciones efectoras de los macrófagos. Los linfocitos T_{H1} también producen FNT, que induce inflamación local.

Las poblaciones linfocitarias citolíticas CD8⁺ reconocen los antígenos procesados en el citoplasma y presentados en asociación con moléculas clase I del CMH. Estos linfocitos se activan, lisan las células infectadas y producen IFN- γ .

Estos dos mecanismos efectores, activación macrofágica y citotoxicidad linfocitaria, se complementan entre sí y actúan juntos. Se ha demostrado que se requiere de los linfocitos T-CD4⁺ fenotipo T_{H1} y T-CD8⁺ para eliminar la infección.

La inmunidad contra las infecciones virales es mediada por una combinación de mecanismos inmunes humorales y celulares. La vacunación profiláctica es efectiva, ya que se estimulan anticuerpos específicos, efectivos en estadios tempranos de la infección. Los anticuerpos antivirales neutralizantes se unen a la envoltura o cápside viral y previenen la unión y entrada a las células del hospedero. La IgA secretoria bloquea las vías de entrada respiratoria e intestinal y los anticuerpos opsonizantes incrementan la fagocitosis. La activación del complemento puede también participar, o por lisis directa o promoviendo la fagocitosis. Sin embargo, una vez que logran penetrar a sus células diana, se hacen inaccesibles a los anticuerpos. El principal mecanismo de la inmunidad contra las infecciones virales establecidas es la lisis celular por los linfocitos TCD8⁺.

En el desarrollo de nuevas vacunas, se debe tener en cuenta que en algunos casos los anticuerpos opsonizantes podrían facilitar la invasión de los virus a las células con receptores Fc. En otras infecciones con virus no citolíticos, como es el caso del virus de la hepatitis B, las células T-CD8⁺ son las responsables de las lesiones tisulares.

Para la prevención de enfermedades virales ha sido muy eficaz la inducción de anticuerpos, aunque la estrategia de nuevas vacunas dirigidas a microorganismos intracelulares consiste en estimular una fuerte respuesta celular y humoral, lo que se ha alcanzado experimentalmente con vacunas de ADN.

Para las enfermedades parasitarias no se cuenta hasta el momento con vacunas efectivas. La habilidad de los parásitos para evadir o resistir la

eliminación por el sistema inmune hace muy difícil su desarrollo, aunque se han logrado discretos avances en algunas vacunas contra la malaria.

Bibliografía

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editores. “Inmunidad frente a los microorganismos”, *Inmunología Celular y Molecular*, 3a ed., Madrid, McGraw-Hill, 2000, pp.379-402.
2. Abraham SN, Sharon N, Ofek I. “Adhesion of Bacteria to Mucosal Surfaces”, en: Ogra P, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors: *Mucosal Immunology*, 2nd ed., London, Academia Press, 1999, pp.31-42.
3. Ahmed R, Biron Ch. “Chapter 39: Immunity to Viruses”, en: Lippincott Williams and Wilkins, editors: *Fundamental Immunology* [monograph on CD-ROM], 4th ed., Version 2.15 [07-15-98], USA, BiblioMed Textbook Software, 1998.
4. Ala’Aldeen DNA. “Vaccine against *Neisseria Meningitidis*: Past, Present and Future”, *Bioteología Aplicada*, 1996; 13:1-7.
5. Amalia M, Anwar N, Leiva T, Arnet A, Sotolongo F, Ison C: “Resultados preliminares de la evaluación de diferentes concentraciones de la suspensión bacteriana empleada como inóculo en el Ensayo Bactericida de Sangre Total”, *VacciMonitor*, 2000; 9(2):14-8.
6. Beneson AS. “Fiebre Tifoidea”, en: Organización Panamericana de la Salud, editor: *Manual para el control de las enfermedades transmisibles*, Washington DC., Publicación Científica OPS, No. 564, 1997, pp.202-7.
7. Bercovier H. “Viejos y nuevos enfoques para el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis”, *VacciMonitor*, 2000; 9(1):1-4.
8. Borrow R, Fox AJ, Cartwright K, Begg NT, Jones DM. “Salivary Antibodies Following Parenteral Immunization of Infants with a Meningococcal Serogroup A and C Conjugates Vaccine”, *Epidemiol Infect*, 1999; 123:201-8.
9. Borrow R, Richmond P, Kaczmarski EB, Iverson A, Martin SL, Findlow J, et. al. “Meningococcal Serogroup C-Specific IgG Antibody Responses and Serum Bactericidal Titres in Children Following Vaccination with a Meningococcal A/C Polysaccharide Vaccine”, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2000; 28:79-85.
10. Cardosa MJ. “Dengue Vaccine Design: Issues and Challenges”, *British Medical Bulletin*, 1998; 54:395-405.
11. Fedson DS. “Pneumococcal Vaccination for Older Adults”, *Drugs & Aging*, 1999; 15 Suppl. 1:21-30.

Dr. Rolando Ochoa Azze

12. Fenner F, Hall AJ, Dowdle WR. "What is Eradication?", en: Dowdle WW, Hopkins DR, editors. *The Eradication of Infectious Diseases*, New York, John Wiley & Sons Ltd, 1998, pp.4-18.
13. Frasch CE. "Meningococcal Vaccines: Past, Present and Future", en: Cartwright K, editor: *Meningococcal Disease*, Gloucester, John Wiley & Sons, 1995, pp.246-83.
14. Galazka AM. *The Immunological Basis for Immunization Series. Module 3. Tetanus*, Geneva, World Health Organization, 1996.
15. Galazka AM. *The Immunological Basis for Immunization Series. Module 2. Diphtheria*, Geneva, World Health Organization, 1996.
16. Galen JE, Gómez G, Losonsky GA, Halpern JL, Lauderbaugh CS, Kaintuck S, et al. "A Murine Model of Intranasal Immunization to Assess the Immunogenicity of Attenuated *Salmonella typhi* Live Vector Vaccines in Stimulating Serum Antibody Responses to Expressed Foreign Antigens", *Vaccine*, 1997; 15:700-8.
17. Guttormsen HK, Kasper DL. "Bacterial Vaccines", en: Austen K.F., Burakoff SJ, Rosen FS, Strom TB, editors. *Therapeutic Immunology*, 2nd ed., Massachusetts, Blackwell Science Inc., 2001, pp. 401-12.
18. Henri Lambert P. "The Value of Vaccination. Remaining Challenges", en: Merieux Foundation, editor. *Proceedings of the Advanced Vaccinology Course*, 2000 May 22 – June 3, Annecy, France, The Merieux Foundation, 2000, p. S I.
19. Heyderman RS, Klein NJ, Daramola OA, Hammerschmidt S, Frosch M, Robertson BD, et al. "Induction of Human Endothelial Tissue Factor Expression by *Neisseria Meningitidis*: the Influence of Bacterial Killing and Adherence to the Endothelium", *Microbial Pathogenesis*, 1997; 22:265-74.
20. Himmelrich H, Launois P, Tacchini F, Louis J. "Some of the Early Events Underlying Th2 Cell Maturation and Susceptibility to *Leishmania* Major Infection in BALB/c Mice", *Biol Chem*, 1999; 380:909-14.
21. Ison CA, Anwar N, Cole MJ, Galassini R, Heyderman RS, Klein NJ, et al. "Assessment of Immune Response to Meningococcal Disease: Comparison of a Whole-Blood Assay and the Serum Bactericidal Assay", *Microb Pathog*, 1999; 27:207-14.
22. Ison CA, Heyderman RS, Klein NJ, Peakman M, Levin M. "Whole Blood Model of Meningococcal Bacteraemia –a Method for Exploring Host-Bacterial Interactions", *Microb Pathog*, 1995; 18:97-107.
23. Kaufmann S. "Chapter 40. Immunity to Intracellular Bacteria", en: Lippincott Williams and Wilkins, editors: *Fundamental Immunology* [monograph on CD-ROM], 4th ed., Version 2.15 [07-15-98], USA, BiblioMed Textbook Software, 1998.
24. Kimble J, Capra D. "Chapter 3: Immunoglobulins: Structure and Function", en: Lippincott Williams and Wilkins, editors: *Fundamental Immunology*

- [monograph on CD-ROM], 4th ed., Version 2.15 [07-15-98], USA, BiblioMed Textbook Software, 1998.
25. Klein M. "AIDS and HIV Vaccines", *Vaccine*, 1999; 17(2 Suppl.):S65-70.
 26. Lagos R, Levine OS, Avendaño A, Horwitz I, Levine M. "The Introduction of Routine *Haemophilus Influenzae* Type b Conjugate Vaccine in Chile: a Framework for Evaluating New Vaccines in Newly Industrializing Countries", *Pediatr Infect Dis J*, 1998; 17 (9 Suppl. 9):139-48.
 27. Lanzavecchia A, Sallusto F. "From Synapses to Immunological Memory: The Role of Sustained T Cell Stimulation", *Curr Opin Immunol*, 2000; 12:92-8.
 28. Lieu TA, Ray G, Black SB, Butler JC, Klein JO, Breiman RF, et al. "Projected Cost-Effectiveness of Pneumococcal Conjugate Vaccination of Healthy Infants and Young Children", *JAMA*, 2000; 283:1460-8.
 29. Lo-Man R, Rueda P, Sedlik C, Deriaud E, Casal I, Leclerc C. "A Recombinant Virus-Like Particle System Derived from Parvovirus as an Efficient Antigen Carrier to Elicit a Polarized Th1 Immune Response without Adjuvant", *Eur J Immunol*, 1998; 28:1401-7.
 30. Martin SL, Borrow R, van der Ley P, Dawson M, Fox AJ, Cartwright KAV. "Effect of Sequence Variation in Meningococcal PorA Outer Membrane Protein on the Effectiveness of a Hexavalent PorA Outer Membrane Vesicle Vaccine", *Vaccine*, 2000; 18:2476-81.
 31. Mc Ghee J, Kiyono H. "Chapter 27: The Mucosal Immune System", en: Lippincott Williams and Wilkins, editors: *Fundamental Immunology* [monograph on CD-ROM], 4th ed., Version 2.15 [07-15-98], USA, BiblioMed Textbook Software, 1998.
 32. Mc Heyzer-Williams MG, Ahmed R. "B Cell Memory and the Long- Lived Plasma Cell", *Curr Opin Immunol*, 1999; 11:172-9.
 33. McGhee JR, Czerkinsky C, Mestecky J. "Mucosal Vaccines: an Overview", en: Ogra P, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. *Mucosal Immunology*, 2nd ed., London, Academic Press, 1999, pp.741-58.
 34. Milagres LG, Lemos APS, Meles CEA, Silva EL, Ferrerira LH, Souza JA, et al. "Antibody Response after Immunization of Brazilian Children with Serogroup C Meningococcal Polysaccharide Noncovalently Complexed with Outer Membrane Proteins", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1995; 28:981-9.
 35. Miller MA, Mc Cann L. "Policy Analysis of the Use of Hepatitis B, *Haemophilus Influenzae* Type b, *Streptococcus Pneumoniae*-Conjugate and Rotavirus Vaccines in National Immunization Schedules", *Health Economics*, 2000; 9:19-35.
 36. Muller M, Zhou J, Reed TD, Rittmuller C, Burger A, Gabelsberger J, et al. "Chimeric Papillomavirus-Like Particles", *Virology*, 1997; 234:93-111.

37. Nahm M, Apicella M, Briles D. "Chapter 41. Immunity to Extracellular Bacteria", en: Lippincott Williams and Wilkins, editors: *Fundamental Immunology* [monograph on CD-ROM], 4th ed., Version 2.15 [07-15-98], USA, BiblioMed Textbook Software, 1998.
38. National Institutes of Health (US). *The Jordan Report 2000. Accelerated Development of Vaccines*, Bethesda, The National Institutes of Health, 2000.
39. Nossal GJ. "Chapter 42. Vaccines", en: Lippincott Williams and Wilkins, editors: *Fundamental Immunology* [monograph on CD-ROM], 4th ed., Version 2.15 [07-15-98], USA, BiblioMed Textbook Software, 1998.
40. Ochoa R, Leiva T. "Mecanismos de defensa frente a las infecciones bacterianas. Capítulo 17", en: Llop A., Valdés-Dapena MM, Zuazo JL, editores: *Microbiología y Parasitología Médicas*, Tomo I, Ciudad de La Habana, Editorial Ciencias Médicas, 2001, pp. 147-52.
41. Ochoa R. "Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos", Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias Médicas, Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, 2002.
42. Pichichero ME, Latiolais T, Bernstein DI, Hosbach P, Christian E, Vidor E, et al. "Vaccine Antigen Interactions after a Combination Diphtheria-Tetanus Toxoid Acellular Pertussis /Purified Capsular Polysaccharide of *Haemophilus Influenzae* Type b Tetanus Toxoid Vaccine in Two, Four and Six Month Old Infants", *Pediatr Infect Dis J*, 1997; 16:863-70.
43. Plotkin SA. "Vaccination against the Major Infectious Diseases", *Life Sciences*, 1999; 322:943-51.
44. Plotkin SA. "Vacunas en el siglo veintiuno", *Vacunas*, 2002; 3:18-28.
45. Rico O, Jiménez R, Pereira C. "Enfermedad meningocócica y VA-MENGOC-BC® en menores de 1 año. Cuba, 1983 a 1991", *Rev Cubana Med Trop*, 1996; 48(1):34-9.
46. Roig de Leuchsenring E. *Médicos y medicina en Cuba. Historia, biografías, costumbrismo*, La Habana, Museo Histórico de las Ciencias Médicas Carlos J Finlay, 1965.
47. Salgado H. *Generalidades en inmunización*, Bogotá, Biotoscana, 1998.
48. Salleras L. "Tecnologías de producción de vacunas I: vacunas vivas atenuadas", *Vacunas*, 2002; 3:29-33.
49. Salleras L. "Tecnologías de producción de vacunas II: vacunas inactivadas", *Vacunas*, 2002; 3:78-84.
50. Salleras L. "Tecnologías de producción de vacunas III: vacunas génicas", *Vacunas*, 2002; 3:145-49.
51. Sallusto F, Lenig D, Foster R, Lipp M, Lanzavecchia A. "Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions", *Nature*, 1999; 401:708-12.

Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas
mediante técnicas inmunoenzimáticas

52. Schafer K, Muller M, Faath S, Henn A, Osen W, Zentgraf H, et al. "Immune Response to Human Papillomavirus 16 LIE 7 Chimeric Virus-Like Particles: Induction of Cytotoxic T Cells and Specific Tumor Protection", *Int J Cancer*, 1999; 81:881-8.
53. Sedlik C, Dridi A, Deriaud E, Saron MF, Rueda P, Sarraseca J, et al. "Intranasal Delivery of Recombinant Parvovirus-Like Particles Elicits Cytotoxic T-Cell and Neutralizing Antibody Responses", *J Virology*, 1999; 73:2739-44.
54. Siegrist CA. "Vaccination in the Neonatal Period and Early Infancy", *Intern Rev Immunol*, 2000; 19:195-219.
55. 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", en: Achtman M., Kohl P., Marchal C, Morelli G, Seiler A, Thiesen B, editors. *Neisseriae 1990. Proceedings of the Seventh International Pathogenic Neisseria Conference*; 1990, Sep. 9-14, Berlin, Walter de Gruyter, 1991, pp.129-34.
56. Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, García IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, et al. "Vaccine against Group B *Neisseria Meningitidis* Protection Trial and Mass Vaccination Results in Cuba", *NIPH Annals*, 1991; 14:195-207.
57. Silverstein A. "Chapter 2: The History of Immunology", en: Lippincott Williams and Wilkins, editors. *Fundamental Immunology* [monograph on CD-ROM], 4th ed., Version 2.15 [07-15-98], USA, BiblioMed Textbook Software, 1998.
58. 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.
59. World Health Organization. *State of the World's Vaccines and Immunization*, Geneva, The World Health Organization, 1997.
60. Young D. "Vaccine Challenges: Tuberculosis", en: Merieux Foundation, editor: *Proceedings of the Advanced Vaccinology Course*; 2000, May 22 – June 3, Annecy, France, The Merieux Foundation, 2000, pp. S VIII.
61. Zaffran M. "Immunize every Child: GAVI Strategy for Sustainable Immunization Services", en: *GAVI Global Alliance for Vaccines and Immunization*, editor, Proceedings of the 2nd Board Meeting, 2000, Jan 31, Davos, Switzerland, 2000, GAVI, 2000, pp.9-44.

Capítulo 2

Métodos para la evaluación de anticuerpos inducidos por vacunas

Los anticuerpos inducidos por vacunas o presentes en la población en estudios seroepidemiológicos, pueden ser medidos por técnicas *in vivo* e *in vitro*. Las pruebas *in vivo* miden directamente la actividad biológica en animales de laboratorio, son sensibles y específicas, pero caras, requieren personal altamente entrenado, mucho tiempo, un gran número de animales y un volumen relativamente grande de suero para su ejecución.

La interacción entre los anticuerpos y los antígenos vacunales puede ser medida por diferentes ensayos *in vitro*; los ensayos *in vitro* funcionales o biológicos, aunque menos engorrosos que los *in vivo*, resultan laboriosos, pero tienen la virtud de correlacionarse con protección. Los no funcionales son simples, sensibles, rápidos y menos caros; sin embargo, no evidencian directamente las funciones biológicas de los anticuerpos. Por lo tanto, los resultados de estas técnicas deben ser interpretados cuidadosamente y verificados contra los métodos *in vivo*.

Las técnicas *ex vivo* simulan los procesos que ocurren *in vivo*, son procedimientos muy ingeniosos y nuevos que como principal virtud tienen el simular, en condiciones de laboratorio, procesos tales como la bacteriemia, que ocurren solamente en seres vivos.

Métodos *in vivo*

Estos bioensayos miden la respuesta de anticuerpos usando un modelo animal.

Los ensayos de neutralización se basan en la propiedad neutralizante de los anticuerpos séricos sobre dosis conocidas de antígeno, como es el caso de la toxina tetánica, la cual, al quedar libre, se detecta en animales de laboratorio, generalmente ratones.

Estos métodos pueden dividirse en tres grupos. El primero se basa en la relación estrecha entre el tiempo promedio de supervivencia y la cantidad de toxina no neutralizada que todavía está presente en la mezcla suero-toxina. El

tiempo exacto es medido durante el período de cinco días que sigue a la inyección de la mezcla de toxina y diferentes diluciones de suero. Estos métodos requieren pocos materiales, pero frecuentes observaciones.

El segundo grupo de métodos se basa en la proporción de ratones que mueren y sobreviven al final de un período determinado de tiempo, después de inocular la mezcla suero-toxina. La principal desventaja es que se requiere un gran volumen de suero cuando es baja la concentración de anticuerpos.

El tercer grupo se basa en la discriminación entre la presencia de síntomas, por ejemplo, parálisis de la pata del ratón inyectado con la mezcla suero-toxina, y la neutralización completa de los síntomas. Este método requiere una menor cantidad de suero, pero es menos exacto y sensible.

La capacidad dermonecrótica de algunos antígenos, como la toxina diftérica, es decir, la capacidad de producir una reacción inflamatoria cuando se inyecta intradérmicamente en la piel de personas o animales, ha sido usada en ensayos de neutralización *in vivo*, en el primer caso tenemos la prueba de Schick, no usada hoy en día para estos fines, principalmente por motivos éticos. Estos ensayos se realizan en conejos o cobayos, inyectando diferentes diluciones del suero con cantidades fijas de toxina en la piel depilada de los animales. La concentración de antitoxina se estima según la ausencia o presencia de la reacción inflamatoria.

Los resultados de estas pruebas dependen de la avidéz del antisuero, la concentración de la toxina y las especies de animales usadas, lo que representa una desventaja adicional a las descritas; sin embargo, los ensayos *in vivo* exploran la capacidad funcional de los anticuerpos.

No existen para todas las vacunas modelos animales, y aunque la aplicación de los métodos *in vivo* en las fases clínicas de vacunas y los estudios seroepidemiológicos estén limitados por las restricciones obvias para procesar un elevado número de muestras, no contar con estos modelos resulta una desventaja en el desarrollo y la fase preclínica de un candidato vacunal.

Métodos *in vitro*

Estos métodos detectan no solamente anticuerpos funcionales, sino también pueden revelar reacciones entre otros sistemas antígeno-anticuerpo, por lo que deben ser calibrados cuidadosamente con los ensayos *in vivo* cuando estén disponibles, o evaluar su respuesta en estudios clínicos de eficacia vacunal o seroepidemiológicos.

Los ensayos *in vitro* pueden ser funcionales o no funcionales. Entre los primeros tenemos:

1. Prueba de neutralización en cultivo de tejidos: Se basa en la observación de que la supervivencia de células en cultivo se inhibe por la presencia de antígeno. Este efecto es neutralizado cuando el anticuerpo específico está presente en las muestras de suero analizadas. Se preparan diferentes diluciones de suero y se mezclan con el antígeno, se añaden las células y después de incubar, se produce un cambio de color proporcional al crecimiento celular, debido a la formación metabólica de ácidos que modifican el pH.
2. Ensayo bactericida en suero: La determinación de la actividad bactericida involucra la exposición de un organismo viable a una concentración adecuada de anticuerpo y complemento, incubación a la temperatura óptima y determinación, después de un período apropiado de tiempo, de la cantidad de organismos vivos. Este ensayo ha sido considerado la “prueba de oro” para evaluar la inmunogenicidad de vacunas antimeningocócicas. Un incremento de los títulos después de la inmunización con vacunas de polisacáridos se correlaciona con la protección. Sin embargo, cuando se ha empleado para evaluar la eficacia de vacunas obtenidas a partir de vesículas de membrana externa del serogrupo B, los resultados obtenidos muestran una subestimación del grado de protección.
3. Otros ensayos funcionales: Aunque con menor frecuencia, por ser menos apropiados para estudios masivos, se han empleado otras técnicas, entre las que destacamos la opsonofagocitosis y la inhibición de la adherencia. El primero se basa en que la ingestión de bacterias y partículas requiere de un contacto íntimo entre estas y la membrana del granulocito neutrófilo, proceso favorecido por la acción de opsoninas séricas, o bien derivadas del sistema del complemento o inmunoglobulinas de la clase IgG. La opsonofagocitosis determina la presencia adecuada de opsoninas en el suero del individuo. La adherencia de los microorganismos es uno de los factores de virulencia más importante y un paso crítico en la colonización y posterior diseminación. Los mecanismos efectores de la inmunidad de mucosa, fundamentalmente IgA secretoria, están encaminados a impedir la adhesión del microorganismo a sus receptores celulares específicos. La inhibición de la adherencia demuestra la existencia de un apropiado nivel de antiadhesinas.

Entre los no funcionales:

1. Técnicas de aglutinación pasiva: Se han empleado eritrocitos o partículas de látex sensibilizadas con el antígeno que aglutinan en presencia de anticuerpos específicos. Son pruebas rápidas y que requieren un equipamiento sencillo. La principal desventaja radica en su preferencia hacia anticuerpos de clase IgM y en su baja correlación con los ensayos *in vivo* a pequeñas concentraciones de anticuerpos.
2. Radioinmunoanálisis (RIA): Esta técnica ha sido usada para la cuantificación de anticuerpos, generalmente empleando una fase sólida (radiometría) para fijar los antígenos de captura para los anticuerpos específicos, que a su vez son detectados por un conjugado anti-inmunoglobulina humana marcada con un isótopo radioactivo. Es alta la sensibilidad y detectabilidad en estos ensayos, sin embargo, sus reactivos y equipamiento son caros, la técnica requiere de personal altamente entrenado y el material radioactivo representa un riesgo potencial.
3. Inmunoensayos enzimáticos: El ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay) resulta la técnica de elección entre los ensayos *in vitro* no funcionales, su sensibilidad y detectabilidad son semejantes al RIA y puede procesarse lo mismo un número pequeño que grande de muestras. El principio de ensayo indirecto se basa en que los anticuerpos en la muestra reaccionan y forman un complejo con los antígenos adsorbidos a la fase sólida, y son detectados por un conjugado similar al descrito en el RIA, a excepción de que en este caso el isótopo radioactivo es sustituido por una enzima. La cantidad de enzima enlazada indica la cantidad de anticuerpos en el suero y puede ser medida por la degradación de su sustrato. Cuando la concentración de anticuerpos es baja, los resultados del ELISA indirecto correlacionan poco con los ensayos *in vivo*, ya que tiende a sobrestimar los sueros de bajos títulos, probablemente esto se deba a la presencia de inmunoglobulinas inespecíficas o anticuerpos de baja afinidad. Otra alternativa han sido los ensayos de inhibición de antígeno, que en este caso se basan en la detección del antígeno no enlazado por anticuerpos específicos adsorbidos en la fase sólida. El fundamento teórico de estas pruebas competitivas se basa en que la unión entre el anticuerpo y el antígeno se favorece cuando este está en solución; sin embargo, estos ELISAs son más complicados, sobre todo cuando se requiere procesar un

gran número de muestras. Los ensayos de doble antígeno, al igual que los indirectos, emplean antígenos de captura vacunales, pero en este caso en lugar de un conjugado anti-inmunoglobulina-enzima, usamos antígeno-enzima, de esta forma se alcanza la máxima sensibilidad y detectabilidad al no ser necesario diluir las muestras; sin embargo, detectamos todas las clases de inmunoglobulinas, lo que en ocasiones no es deseable.

La posibilidad de detectar diferentes clases de inmunoglobulinas es una ventaja adicional del ELISA y el RIA.

Métodos *ex vivo*

Son ensayos *in vitro* que simulan los procesos que ocurren *in vivo*. El ensayo de sangre total es un modelo de bacteriemia que evalúa las interacciones de la bacteria y el hospedero. La habilidad del microorganismo de sobrevivir en la sangre depende, entre otros factores, de los atributos patogénicos y del estado fisiológico de la célula bacteriana cuando penetra en el torrente sanguíneo. En este ensayo se realiza la unión de la sangre a evaluar con la bacteria cuando la célula se encuentra en su fase exponencial de crecimiento. Este modelo es una medida sensible de actividad bactericida, que integra la actividad opsonizante de los anticuerpos, de las opsoninas derivadas de la activación del sistema del complemento, y la fagocitosis ulterior, además de la lisis mediada por anticuerpos y el complemento autólogo. Se ha usado eficazmente para evaluar la respuesta antimeningocócica, y resulta una herramienta más sensible que los clásicos ensayos bactericidas en suero, sobre todo para meningococo B. Como limitante podemos señalar su laboriosidad, su ejecución inmediata al muestreo, y el poco número de muestras que pueden procesarse en cada jornada.

Inmunoensayos enzimáticos

Para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo se han usado diferentes métodos; de los basados en la inmunoprecipitación y la aglutinación, que adolecen de insuficiente sensibilidad y detectabilidad, se pasó a los que emplean diferentes marcadores para evidenciar dicha reacción. Se han usado isótopos radioactivos, compuestos fluorescentes y quimioluminiscentes, marcadores electroactivos, lantánidos, radicales libres estables, partículas de látex, liposomas, colorantes, coloides y bacteriófagos, entre otros. Los

ensayos que usan como marcador enzimas (inmunoensayos enzimáticos) presentan extraordinarias ventajas aún no superadas, tales como:

- Elevada sensibilidad, detectabilidad y especificidad.
- Equipamiento relativamente barato.
- Procedimientos técnicos rápidos y sencillos.
- Alta precisión y exactitud.
- Reactivos relativamente baratos y de larga vida.
- Gran variedad de sustratos y cromógenos que incrementa su versatilidad.

Los inmunoensayos enzimáticos constituyen el desarrollo ulterior de los radioinmunoensayos; en lugar de los peligrosos radioisótopos de corta vida media, se emplean enzimas como sustancias marcadoras. Estos ensayos surgieron a mediados de la década de los 60 para la identificación y localización intracelular de antígenos, y han tenido un auge vertiginoso, su uso se ha ampliado para la detección de un diverso número de antígenos y anticuerpos.

Estos ensayos se apoyan en tres características biológicas fundamentales: la extraordinaria especificidad de los anticuerpos, el elevado poder catalítico y la alta especificidad de las enzimas. Mediante la combinación de la reacción inmunológica con un indicador altamente sensible, el débil efecto inmunológico se ve reforzado por la amplificación enzimática, de forma que se consigue una elevada sensibilidad y detectabilidad, si a esto le añadimos la especificidad de la reacción inmunológica, se podrá comprender su aplicabilidad en el diagnóstico clínico. Gracias a ello se han podido estudiar hormonas, fármacos, péptidos y proteínas, vitaminas, agentes patógenos, otros analitos y, por supuesto, anticuerpos dirigidos contra los propios constituyentes del organismo (autoanticuerpos), contra diversos microorganismos o contra inmunógenos vacunales. La reacción antígeno-anticuerpo se detecta generalmente mediante un cambio de color o la emisión de luz, producidos por la interacción de la enzima y su sustrato. Ambos efectos son cuantificables y proporcionales a la intensidad de la interacción. El uso de sustratos de depósito permite la visualización de los resultados y es muy utilizado sobre membranas.

Enzimas y substratos

La popularidad de las enzimas como elemento marcador se debe a su enorme poder catalítico, su alta especificidad, el amplio espectro de substratos que pueden usarse y la gran estabilidad de los conjugados.

Existen determinados criterios de selección para una enzima marcadora:

- Económica y alto grado de pureza en su obtención.
- Presencia de grupos reactivos para la unión covalente.
- La conjugación debe ser sencilla y los conjugados activos y estables.
- Estable en forma libre y conjugada.
- Elevada actividad catalítica.
- Soluble.
- Sencilla, sensible y mensurable.
- No debe hallarse en el medio a examinar.
- Los elementos procedentes del material a examinar no deben interferir con la prueba.
- La actividad debe conservarse en las condiciones de la prueba.
- Disponibilidad de substratos estables, baratos y no tóxicos que permitan la formación de productos estables.
- En los ensayos heterogéneos debe ser mínima la influencia de la fase sólida sobre la actividad enzimática.
- Las enzimas usadas en los ensayos homogéneos deben conjugarse fácilmente cerca del sitio activo sin que se altere su actividad.

Las enzimas más usadas en los ensayos heterogéneos son: peroxidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa oxidasa, ureasa, glucoamilasa, acetilcolinesterasa, glutamato descarboxilasa y anhidrasa carbónica. Entre ellas, la primacía la tienen las dos primeras.

En los ensayos homogéneos tenemos la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, lisosima, malato deshidrogenasa, hexoquinasa, β -galactosidasa, amilasa y fosfolipasa C.

La peroxidasa es la enzima más empleada, son hemoproteínas que transfieren el hidrógeno de moléculas donadoras al peróxido de hidrógeno. Se conjugan fácilmente, tienen una elevada actividad catalítica y un gran número de cromógenos que permiten la lectura fotométrica; 3,3',5,5'-tetrametil-

bencidina, orto-fenilendiamina y 2,2'-azino-bis (ABTS), y con ellos se alcanza una elevada sensibilidad y detectabilidad. Los de depósito, 4- cloro-1-naftol, 3-amino-9-etilcarbazol y 3,3'-diaminobencidina, son muy apropiados para la visualización de los resultados. Aunque es posible la lectura por fluorescencia con el ácido para-hidroxifenil acético y el ácido 3,4 hidroxifenil propiónico, no es habitualmente empleada por no representar, en este caso, una ventaja adicional con respecto a los sustratos cromogénicos.

La fosfatasa alcalina es de más difícil conjugación, sin embargo, sus conjugados son muy estables. Hidroliza numerosos ésteres de fosfato, lo que le permite tener un gran número de sustratos, entre ellos el cromogénico, para-nitrofenil fosfato, el sustrato fluorogénico, 4-metil umbeliferil fosfato, y el de depósito 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato con azul de nitrotetrazolio. Aunque la sensibilidad, para sustratos cromogénicos, es inferior a la que puede alcanzarse con la peroxidasa, la fosfatasa alcalina reúne otras ventajas, es menos dependiente de factores interferentes como la hemoglobina en la muestra, y la lectura, en la mayor parte de los ensayos, puede hacerse sin que se requiera detener la reacción.

Como hemos visto, la actividad enzimática puede estimarse mediante fluorimetría, luminometría o colorimetría, como medida de los productos solubles formados, o mediante sustratos de depósito. Los productos fluorescentes y luminiscentes brindan generalmente una superior sensibilidad, detectabilidad y permiten una mayor dilución de los inmunoreactantes, así como una reducción del tiempo de ejecución de los ensayos y del volumen de reacción. Sin embargo, la colorimetría sigue siendo el método más empleado debido a la posibilidad de evaluación visual, un equipamiento más sencillo y la mayor estabilidad de los productos formados, a esto puede añadirse que en la evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por vacunas, habitualmente es suficiente la sensibilidad y detectabilidad que se alcanzan con la lectura fotométrica. De ahí que no se requiera tampoco la amplificación de la respuesta con ciclos enzimáticos como pudieran ser los redox de alcohol deshidrogenasa/diaforasa, utilizando como enzima inicial la fosfatasa alcalina y el NADP como sustrato. No obstante el uso de sustratos fluorogénicos, luminométricos u otros métodos de amplificación, deben tenerse en cuenta cuando se requiera una elevada sensibilidad y detectabilidad, como pudiera ser la evaluación de la inmunidad en mucosas u otros líquidos corporales con baja concentración de anticuerpos.

Clasificación de los ensayos inmunoenzimáticos

Existen diferentes criterios de clasificación para los inmunoensayos enzimáticos que según la naturaleza del sistema pueden ser competitivos o no, conforme a la naturaleza del conjugado se han identificado los ensayos con antígenos o anticuerpos marcados. Sin embargo, la clasificación más usada se basa en si se requiere o no de procedimientos para separar las fases del ensayo; de acuerdo con este criterio los inmunoensayos enzimáticos se clasifican respectivamente en heterogéneos y homogéneos. Es preferible hablar de separación de fases en lugar del empleo o no de lavados, ya que existen otros métodos, como los basados en principios inmunocromatográficos, lo que nos puede llevar a un error de clasificación.

Inmunoensayos enzimáticos homogéneos

Estos inmunoensayos se ejecutan sin una fase sólida y no requieren la separación entre los reactantes enlazados y libres. Su principio se basa en una inhibición o activación de la reacción enzimática por el complejo antígeno-anticuerpo. En la reacción enzimática de comprobación, esta actividad catalítica se mide en comparación con el conjugado libre, lo que hace superflua la separación de fases, razón por la cual se le denomina ensayo homogéneo.

Pueden dividirse en competitivos y no competitivos. En los primeros el clásico conjugado antígeno-enzima, es modulado por la reacción antígeno-anticuerpo, o por impedimento estérico o cambio en la configuración de la enzima. En lugar de la enzima puede conjugarse el sustrato; en este caso, el anticuerpo bloqueará su degradación. En ambos procedimientos el antígeno libre disminuirá esta modulación. Existen además otras múltiples variantes, en una de ellas se emplean conjugados antígeno-cofactor, y la actividad enzimática es bloqueada por el anticuerpo a menos que haya suficiente antígeno libre. Otra variante se fundamenta en la inhibición enzimática inducida por un conjugado avidina-hapteno al conjugado biotina-enzima y su bloqueo por la acción de anticuerpos. En todo caso, estas y otras variantes responden a los principios expuestos para estos ensayos.

En los no competitivos, la distinción entre los elementos libres y enlazados se logra usando diferentes conjugados dirigidos contra distintos epítomos del antígeno, y el producto de una de las enzimas seleccionadas es el sustrato para la otra. No han tenido un amplio uso por no constituir una opción para los ensayos heterogéneos.

En los ensayos homogéneos, si bien queda eliminada la fase de separación, se introduce el riesgo de que los componentes de la muestra puedan interferir en la actividad enzimática. Sin embargo, la mayor limitante resulta que son considerablemente menos sensibles que los heterogéneos, lo que no los convierte en una alternativa real para la detección de anticuerpos. Estos ensayos se prestan principalmente para sustancias de bajo peso molecular (haptenos) y de concentración relativamente alta; por ejemplo, farmacovigilancia de drogas.

Inmunoensayos enzimáticos heterogéneos

En el inmunoensayo enzimático heterogéneo conocido con el nombre ELISA, siempre se realiza una separación entre el inmunocomplejo formado sobre la fase sólida y las biomoléculas no fijadas. Esta separación puede hacerse por simple aspiración y lavado, lo que permite eliminar todos los componentes de la muestra que podrían interferir en el ensayo. La separación entre los inmunorreactantes libres y fijados puede hacerse también por sedimentación, captura de los inmunocomplejos de interés, filtración, difusión radial y otros principios inmunocromatográficos que han servido de base a ensayos rápidos, sencillos y que no requieren equipamiento, muy apropiados para el diagnóstico individual. No obstante, los lavados continúan siendo el procedimiento de elección y son necesarios entre cada paso de reacción, lo que obstaculiza la automatización. Esta limitante se ha superado con el uso de ensayos, cuando es posible, en un solo paso, en el que se añaden simultáneamente los inmunorreactantes, dirigidos contra diferentes epítomos, de esta forma se requiere lavar tan sólo en el paso previo al sustrato.

La técnica ELISA se fundamenta en la premisa de que luego de acoplar antígenos solubles o anticuerpos a una matriz sólida insoluble, éstos retienen la actividad inmunológica y en que estas biomoléculas también pueden unirse a una enzima, reteniendo el conjugado resultante, tanto la actividad enzimática como inmunológica.

Además de haptenos, en el ELISA también es posible determinar moléculas de alto peso molecular. Sin embargo, su principal ventaja está dada en su alto grado de sensibilidad, detectabilidad, precisión y exactitud, lo que hace que los inmunoensayos enzimáticos según el principio ELISA puedan equipararse a los radioinmunoensayos, sin sus desventajas.

Clasificación de los ELISAs

Existen diferentes clasificaciones para los ELISAs, algunas de ellas contradictorias, aunque basadas fundamentalmente en los principios de reacción. Generalmente se proponen una serie de métodos básicos a partir de los cuales se derivan una serie de variantes. Los ELISAs pueden ser competitivos o no competitivos.

En los ensayos competitivos, los anticuerpos o los antígenos son inmovilizados sobre la fase sólida y su unión con el conjugado antígeno-enzima o anticuerpo-enzima, es inhibida por la presencia de analito no marcado en la muestra. Las incubaciones entre muestras y conjugados pueden ser simultáneas o secuenciales, con esta última variante se alcanza una mayor detectabilidad y es recomendada cuando se quieren detectar anticuerpos de baja afinidad. En general la sensibilidad y detectabilidad de estos ensayos es inferior a otros ELISAs que luego describiremos. Algunos autores consideran el principio de inhibición como no competitivo; sin embargo, ocurre una competencia tal y como sucede con otros ensayos fundamentados en este principio, ya que aunque el antígeno en solución reacciona previamente con el anticuerpo libre, la reacción puede desplazarse hacia el inmunorreactante de captura. Estos ensayos son útiles para la evaluación de la respuesta inmune humoral, aunque laboriosos tienen la ventaja de favorecer la interacción antígeno-anticuerpo que se realiza en la fase líquida, correlacionando habitualmente bien con los ensayos *in vivo*.

Los ensayos heterogéneos no competitivos pueden subdividirse de acuerdo al inmunorreactante inmovilizado, serán, por tanto, ensayos de captura de anticuerpos o de antígenos. Entre los primeros se destaca el principio de ensayo indirecto (Figura 2.1), en el cual los antígenos capturan a los anticuerpos y la reacción se evidencia por el conjugado anti-inmunoglobulina-enzima, o proteína A-enzima, y la degradación ulterior del sustrato. Este método es el de elección para detectar anticuerpos de clase IgG o IgA. La IgM puede estudiarse previa absorción de los anticuerpos IgG, aunque este isotipo debe estudiarse preferentemente con ensayos de captura IgM. Los ensayos indirectos presentan una alta detectabilidad que depende de la densidad de epítopos de relevancia diagnóstica presentes en la fase sólida.

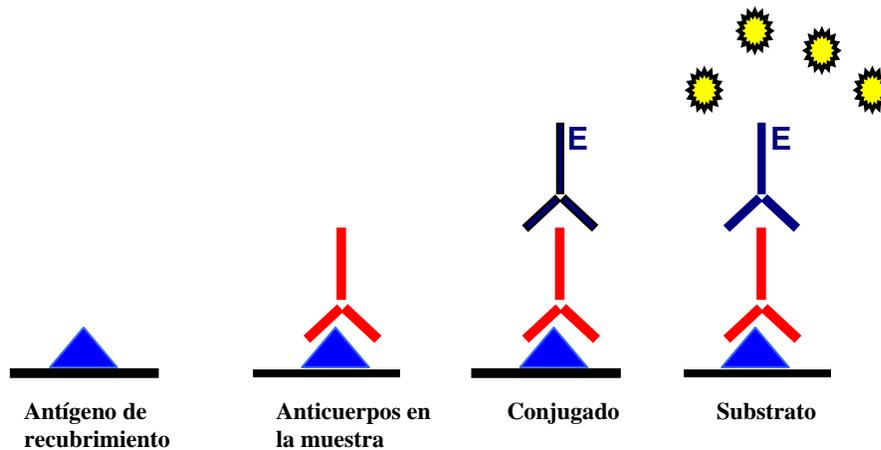


Figura 2.1. ELISA indirecto.

El ensayo sándwich doble anticuerpo es el ejemplo clásico de métodos para la detección de antígenos, el primer anticuerpo captura el antígeno de la muestra que es detectado a través del conjugado anticuerpo-enzima o amplificado con un conjugado dirigido contra el segundo anticuerpo (sándwich doble anticuerpo modificado). Los ensayos sándwich doble antígeno (Figura 2.2), son usados para la detección de anticuerpos y son muy útiles para la evaluación de la respuesta inmune inducida por vacunas; en estos ensayos, al igual que en los indirectos, los antígenos de captura son los vacunales, pero en esta ocasión en lugar de un conjugado anti-inmunoglobulina-enzima, usamos antígeno-enzima, de esta forma se alcanza la máxima sensibilidad y detectabilidad al no ser necesario diluir las muestras; sin embargo, detectamos todas las clases de inmunoglobulinas, lo que en ocasiones, como ya señalamos, no es conveniente. En general los ensayos sándwich son más apropiados para la automatización de los sistemas ELISA, ya que puede disminuirse un paso de reacción añadiendo simultáneamente muestras y conjugado, aunque hay que prever las posibles interferencias del conjugado, a elevadas concentraciones de antígenos o anticuerpos en la muestra.

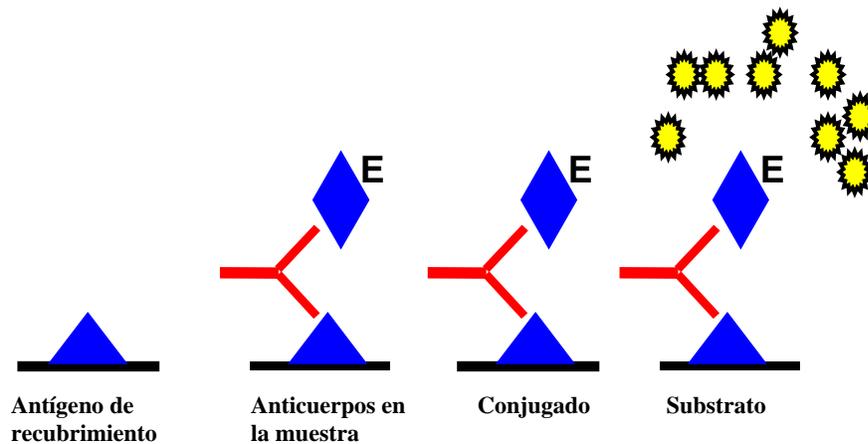


Figura 2.2. ELISA sandwich doble antígeno.

Los ensayos de captura deben usarse si queremos estudiar, mediante la detección de IgM, la respuesta primaria inducida por inmunógenos vacunales timodependientes, o la producción de IgM en los timoindependientes, estos ensayos son también usados en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Los anticuerpos anti IgM inmovilizados capturan la IgM de la muestra, que a su vez reacciona con el antígeno conjugado con una enzima, o sin marcar, lo que requiere de un paso adicional con un anticuerpo marcado. De esta forma se verifica si están presentes los anticuerpos específicos para el isotipo capturado.

La detectabilidad de todos estos ensayos puede incrementarse usando métodos de amplificación no inmunológicos (por ejemplo el sistema avidina-biotina y cascadas enzimáticas) o inmunológicos (como el sistema peroxidasa-antiperoxidasa).

La selección de uno u otro principio depende principalmente de los propósitos del ensayo, la disponibilidad y calidad de los reactivos, su utilización en la práctica y la necesidad o no de su ajuste a un formato de estuche de reactivos. Para evaluar la inmunogenicidad de un candidato vacunal o realizar estudios seroepidemiológicos de enfermedades inmunoprevenibles, deben valorarse los ensayos sándwich doble antígeno o

los de inhibición, cuyas ventajas hemos descrito, aunque es insustituible el ensayo indirecto con el uso de conjugados específicos de clase, sobre todo IgG para estudiar la respuesta secundaria e IgA cuando se requiera evaluar la inmunidad de mucosa.

Bibliografía

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editores: “Inmunidad frente a los microorganismos”, en: *Inmunología Celular y Molecular*, 3a ed., Madrid, McGraw-Hill, 2000, pp.379-402.
2. Abraham SN, Sharon N, Ofek I: “Adhesion of Bacteria to Mucosal Surfaces”, en: Ogra P., Mestecky J., Lamm M.E., Strober W., Bienenstock J., McGhee J.R., editors: *Mucosal Immunology*, 2nd ed., London, Academia Press, 1999, pp.31-42.
3. Acanda ME, Leiva T, Bolaños G, Quintero R, Sotolongo F, Martínez I, et al. “Adherencia de *Neisseria meningitidis* a células epiteliales”, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 1997; 17:149-52.
4. Aggerbeck H, Norgaard-Pedersen B, Heron I. “Simultaneous Quantitation of Diphtheria and Tetanus Antibodies by Double Antigen, Time-Resolved Fluorescence Immunoassay”, *Journal of Immunological Methods*, 1996; 190:171-83.
5. Amalia M, Anwar N, Leiva T, Arnet A, Sotolongo F., Ison C. “Resultados preliminares de la evaluación de diferentes concentraciones de la suspensión bacteriana empleada como inóculo en el Ensayo Bactericida de Sangre Total”, *VacciMonitor*, 2000; 9(2):14-8.
6. Andersen J, Berthelsen L, Lind I. “Measurement of Antibodies against Meningococcal Capsular Polysaccharide B and C in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay towards an Improved Surveillance of Meningococcal Disease”, *Clin Diag Lab Immunol*, 1997; 4:345-51.
7. Ann NQ, Hong HA, Nhon TN, Think ND, Van NT, Hendriks J. “Tetanus Antibodies Measured by the Toxin Binding Inhibition Test (ToBI) in Mothers and Children in the Neonatal Tetanus Program in Vietnam”, *Dev Biol Stand*, 1999; 101:247-53.
8. Avrameas S. “Indirect Immunoenzyme Techniques for the Intracellular Detection of Antigens”, *Immunochemistry*, 1969; 6:825-31.
9. Beristain CN, Rojkin LF, Lorenzo LE. “Evaluation of a Dipstick Method for the Detection of Human Immunodeficiency Virus Infection”, *J Clin Lab Anal*, 1995; 9:347-50.
10. Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, et al. “Efficacy, Safety and Immunogenicity of Heptavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Children”, *Pediatr Infect Dis J*, 2000; 19:187-95.

11. Bonin E, Tiru M, Hallander H, Bredberg-Raden U. "Evaluation of Single-and Dual Antigen Delayed Fluorescence Immunoassay in Comparison to an ELISA and the in Vivo Toxin Neutralisation Test for Detection of Diphtheria Toxin Antibodies", *J Immunol Methods*, 1999; 230:131-40.
12. Borrow R, Fox AJ, Cartwright K, Begg NT, Jones DM. "Salivary Antibodies Following Parenteral Immunization of Infants with a Meningococcal Serogroup A and C Conjugates Vaccine", *Epidemiol Infect*, 1999; 123:201-8.
13. Borrow R, Richmond P, Kaczmarski EB, Iverson A, Martin SL, Findlow J, et al. "Meningococcal Serogroup C-Specific IgG Antibody Responses and Serum Bactericidal Titres in Children Following Vaccination with a Meningococcal A/C Polysaccharide Vaccine", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2000; 28:79-85.
14. *British Pharmacopoeia 1998*, 1st. ed., London, The Stationery Office, 1998. Diphtheria Antitoxin, pp.2031-2.
15. *British Pharmacopoeia 1998*, 1st. ed., London, The Stationery Office, 1998. Tetanus Antitoxin, pp.2036-7.
16. Campagne G, Garka A, Fabre P, Schuchat A, Riall R, Boulanger D, et al. "Safety and Immunogenicity of Three Doses of a *Neisseria Meningitidis*A+C Diphtheria Conjugate Vaccine in Infants from Niger", *Pediatr Infect Dis J*, 2000; 19:144-50.
17. Catt K, Tregear GW. "Solid-Phase Radioimmunoassay in Antibody Coated Tubes", *Science*, 1967; 158:1570-2.
18. Dokmetjian J, Della Valle C, Lavigne V, De Lujan CM, Manghi MA. "A Possible Explanation for the Discrepancy between ELISA and Neutralizing Antibodies to Tetanus Toxin", *Vaccine*, 2000; 18:2698-703.
19. Ellis RW. "Immunological Correlates for Efficacy of Combination Vaccines", en: Ellis RW, editor. *Combination Vaccines: Development, Clinical research, and Approval*, Totowa (NJ), Humana Press Inc, 1999, pp.107-31.
20. Engvall E. and Perlman P. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labelled Anti-Immunoglobulin in Antigen Coated Tubes", *J Immunol*, 1972; 109:129-35.
21. Esser P. "Principles in Adsorption to Polystyrene", *Nunc Bulletin*, 1988; 11(6):1-5.
22. Fayol V, Ville G. "Evaluation of Automated Enzyme Immunoassays for several Markers for Hepatitis A and B Using the Abbott IMx[®] Analyser", *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1991; 29:67-70.
23. Galazka AM. *The Immunological Basis for Immunization Series. Module 3. Tetanus*, Geneva, World Health Organization, 1996.
24. Galazka AM. *The Immunological Basis for Immunization Series. Module 2. Diphtheria*, Geneva, World Health Organization, 1996.

25. Gheesling LL, Carlone GM, Pais LB, Holder PF, Maslanka SE, Plykaytis BD, et al. "Multicenter Comparison of *Neisseria Meningitidis* Serogroup C Anti-Capsular Polysaccharide Antibody Levels Measured by a Standardized Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", *J Clin Microbiol*, 1994; 32:1475-82.
26. Harlow E, Lane D, editors. "Immunoassays", en: *Antibodies. A laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1998, pp.553-612.
27. Heyderman RS, Klein NJ, Daramola, OA, Hammerschmidt S, Frosch M, Robertson BD, et al. "Induction of Human Endothelial Tissue Factor Expression by *Neisseria Meningitidis*: the Influence of Bacterial Killing and Adherence to the Endothelium", *Microbial Pathogenesis*, 1997; 22:265-74.
28. Hong HA, Ke NT, Nhon TN, Think ND, Van der Gun JW, Hendriks JT, et al. "Validation of the Combined Toxin-Binding Inhibition Test for Determination of Neutralizing Antibodies against Tetanus and Diphtheria Toxins in a Vaccine Field Study in Viet Nam", *Bull World Health Organ*, 1996; 74:275-82.
29. Infante JF, Esnard S, Sifonte S, Pérez P, Callis AH, Torres V, et al. "Obtención de un modelo para la meningitis producida por *Haemophilus influenzae* tipo b, utilizando el curiel Duncan Hartley", *VacciMonitor*, 1999; 8(4):2-8.
30. Infante JF, Sierra G, Campa C, Acosta A, Azahares E, Pérez V, et al. "Las ratas SPF como modelo experimental para la enfermedad meningocócica y evaluación de la efectividad de VA-MENGOC-BC[®] II. Estudio microbiológico e inmunológico", *VacciMonitor*, 1997; 6(7):2-6.
31. Infante JF, Sierra G, Campa C, Pérez V, Muñoz P, Gutiérrez M, et al. "Las ratas SPF como modelo experimental para la enfermedad meningocócica y evaluación de la efectividad de VA-MENGOC-BC[®] I. Estudio clínico-anatomopatológico", *VacciMonitor*, 1997; 6(2):2-6.
32. Ison CA, Anwar N, Cole MJ, Galassini R, Heyderman RS, Klein NJ, et al. "Assessment of Immune Response to Meningococcal Disease: Comparison of a Whole-Blood Assay and the Serum Bactericidal Assay", *Microb Pathog*, 1999; 27: 207-14.
33. Ison CA, Heyderman RS, Klein NJ, Peakman M, Levin M. "Whole Blood Model of Meningococcal Bacteraemia –a Method for Exploring Host-Bacterial Interactions", *Microb Pathog*. 1995; 18:97-107.
34. Johannsson A, Stanley CJ, Self CH. "A Fast Highly Sensitive Colorimetric Enzyme Immunoassay System Demonstrating Benefits of Enzyme Amplification in Clinical Chemistry", *Clin Chim Acta*, 1985; 148:119-24.
35. Kimble J, Capra D. "Chapter 3: Immunoglobulins: Structure and Function", en: Lippincott Williams and Wilkins, editors: *Fundamental Immunology* [monograph on CD-ROM], 4th ed., Version 2.15 [07-15-98], USA, BiblioMed Textbook Software, 1998.

36. Lim P, Tam FC, Cheong Y, Jegathesan M. "One-Step 2-Minute Test to Detect Typhoid Specific Antibodies Based on Particle Separation in Tubes", *Journal of Clinical Microbiology*, 1998; 36:2271-8.
37. Lovborg U. *Guide to Solid Phase Immunoassays*, Roskilde, Denmark, Nunc, 1984.
38. Maslanka SE, Gheesling LL, Libutti DE, Donaldson KB, Harakeh HS, Dykes JK, et al. "Standardization and a Multilaboratory Comparison of *Neisseria Meningitidis* Serogroup A and C Serum Bactericidal Assays. The Multilaboratory Study Group", *Clin Diagn Lab Immunol*, 1997; 4:156-67.
39. Maslanka SE, Tappero JW, Plikaytis BD, Brumberg RS, Dykes JK, Gheesling LL, et al. "Age-Dependent *Neisseria Meningitidis* Serogroup C Class-Specific Antibody Concentrations and Bactericidal Titers in Sera from Young Children from Montana Immunized with a Licensed Polysaccharide Vaccine", *Infect Immun*, 1998; 66:2453-9.
40. May K, Evans M, Richards I, inventors. "Immunocromatography. UK Patent Application GB 2204398 A", 1988, Nov. 9.
41. Mc Ghee J, Kiyono H. "Chapter 27: The Mucosal Immune System", en: Lippincott Williams and Wilkins, editors: *Fundamental Immunology* [monograph on CD-ROM], 4th ed., Version 2.15 [07-15-98], USA, BiblioMed Textbook Software, 1998.
42. McGhee JR, Czerkinsky C, Mestecky J. "Mucosal Vaccines: an Overview", en: Ogra P, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. *Mucosal Immunology*, 2nd ed., London, Academic Press, 1999, pp.741-58.
43. Ngo TT, Lenhoff HM. "New Approach to Heterogeneous Enzyme Immunoassays Using Tagged Enzyme-Ligand Conjugates", *Biochem Biophys Res Commun*, 1981; 99:496-503.
44. Ochoa R, Leiva T. "Mecanismos de defensa frente a las infecciones bacterianas. Capítulo 17", en: Llop A., Valdés-Dapena MM, Zuaso JL, editores. *Microbiología y Parasitología Médicas*, Tomo I, Ciudad de La Habana, Editorial Ciencias Médicas, 2001, pp. 147-52.
45. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R, et al. "Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas", *VacciMonitor*, 2000; 9(3):13-8.
46. Ochoa R.: "A New Format ELISA for the Detection of HBsAg", *Biotecnología Aplicada*, 1998; 15:250-3.
47. Ochoa R. "Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos", Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias Médicas, Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, 2002.
48. Oellerich M. "Enzyme Immunoassay: A Review", *J Clin Chem Clin Biochem*, 1984; 22:895-904.

49. Porstmann B, Porstmann T, Nugel E, Evers U. "Which of the Commonly Used Marker Enzymes Gives the Best Results in Colorimetric and Fluorimetric Enzyme Immunoassays: Horseradish Peroxidase, Alkaline Phosphatase or Beta-Galactosidase?", *J Immunol Methods*, 1985; 79:27-37.
50. Porstmann B, Porstmann T, Nugel E. "Comparison of Chromogens for the Determination of Horseradish Peroxidase as a Marker in Enzyme Immunoassay", *J Clin Chem Clin Biochem*, 1981; 19:435-9.
51. Rosenqvist E, Hoiby EA, Bjune G, Aase A, Halstensen A, Lehmann AK, et al. "Effect of Aluminium Hydroxide and Meningococcal Serogroup C Capsular Polysaccharide on the Immunogenicity and Reactogenicity of a Group B *Neisseria Meningitidis* Outer Membrane Vesicle Vaccine", *Dev Biol Stand*, 1998; 92:323-33.
52. Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF. "Homogeneous Enzyme Immunoassay. A New Immunochemical Technique", *Biochem Biophys Res Commun*, 1972; 47:846-51.
53. Schuurs AH, van Weemen BK. "Enzyme-Immunoassay: a Powerful Analytical Tool", *J Immunoassay*, 1980; 1:229-49.
54. Skoura L, Efstratiou A, Tsakris A, Pournaras S, George RC, Douboyas J. "Study on the Use of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Determining Human Antibodies to Diphtheria Toxin as Compared with a Reference Toxin Neutralization Assay", *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1999; 22:181-6.
55. Sotolongo F. *Neisseria meningitidis: Aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune*, 3ra ed., Ciudad de La Habana, Ed. Finlay, 1995.
56. Tappero J, Lagos R, Maldonado A, Plikaytis B, Williams D, Dykes J, et al. "Immunogenicity of 2 Serogroup B Outer Membrane Protein Meningococcal Vaccines", *JAMA*, 1999; 281:1520-7.
57. Tijssen P. "Non-Immunologic Molecular Recognition Systems Used in Immunoassays", en: Burdon R.H., van Knippenberg P.H., editors: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, London, Elsevier, 1993, pp.21-37.
58. Tijssen P. "Outline of the Strategies for Enzyme Immunoassays", en: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, London, Elsevier, 1993, pp. 9-20.
59. Tijssen P. "Processing of Data and Reporting of Results of Enzyme Immunoassays", en: Burdon R.H., van Knippenberg P.H., editors: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, London, Elsevier, 1993, pp.385-421.
60. Tijssen P. "Properties and Preparation of Enzymes Used in Enzyme-Immunoassays", en: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors. *Laboratory*

- Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, London, Elsevier, 1993, pp.173-219.
61. Tijssen P. "The Immobilization of Immunoreactants on Solid Phases", en: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, London, Elsevier, 1993, pp.297-328.
 62. Van Ingen HE, Chan DW, Hubl W, Miyachi H, Molina R, Pitzel L, Ruibal A, Rymer JC, Domke I. "Analytical and Clinical Evaluation of an Electrochemiluminescence Immunoassay for the Determination of CA 125", *Clin Chem*, 1998; 44:2530-6.
 63. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Nuffield Laboratories of Comparative Medicine, Dynatech Europe, Borough House, Guernsey, UK, ed., London, 1979.
 64. Winsnes R, Hendriksen C, Sesardic D, Akkermans A, Daas A. "Serological Assays as Alternatives to the Ph Eur Challenge Test for Batch Release of Tetanus Vaccines for Human Use", *Dev Biol Stand*, 1999; 101:277-88.
 65. World Health Organization. "Potency Control of Bacterial Vaccines", en: *Manual of Laboratory Methods for Testing of Vaccines Used in the WHO Expanded Programme on Immunization*, Geneva, The World Health Organization, 1997, pp.99-180.

Capítulo 3

Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas

¿Qué inmunoensayo debemos seleccionar?

Ante todo debemos precisar qué principio usar para evaluar la inmunogenicidad de una vacuna o candidato vacunal que induzca la producción de anticuerpos. Podemos seleccionar el clásico ensayo indirecto (Figura 2.1. Capítulo 2) o los nuevos ensayos de doble antígeno (Figura 2.2. Capítulo 2), en este caso cuando se requiera una elevada sensibilidad y no constituya un inconveniente detectar otras clases de inmunoglobulinas. Cuando se quiere detectar IgG, característico de la respuesta secundaria, es insustituible el ensayo indirecto con el uso de conjugados específicos de clase. Los ensayos de inhibición, aunque laboriosos, tienen la ventaja de favorecer la interacción antígeno-anticuerpo que se realiza en la fase líquida, correlacionando habitualmente bien con los ensayos *in vivo*.

Debemos usar ensayos de captura (Figura 3.1) si queremos estudiar, mediante la detección de IgM, la respuesta primaria inducida por inmunógenos vacunales timodependientes, o la producción de IgM en los timoindependientes. Puede también emplearse el ensayo indirecto, previa depleción de la IgG con antisueros anti-IgG cadena γ (Factor Absorbente), finalmente el conjugado anti-IgM detecta esta inmunoglobulina fijada al antígeno de captura (Figura 3.2).

La IgA puede ser analizada con ensayos indirectos, sobre todo en las secreciones, donde su concentración es proporcionalmente elevada.

Para detectar subclases de inmunoglobulinas usaremos ensayos indirectos amplificados con doble conjugado; antisubclase-biotinilada y estreptavidina-enzima.

Por último, debemos precisar si el inmunoensayo debe ser cuantitativo o cualitativo. Cuando sea factible debemos optimizarlo cuantitativo, ya que de esta forma podemos reflejar la magnitud de la respuesta.

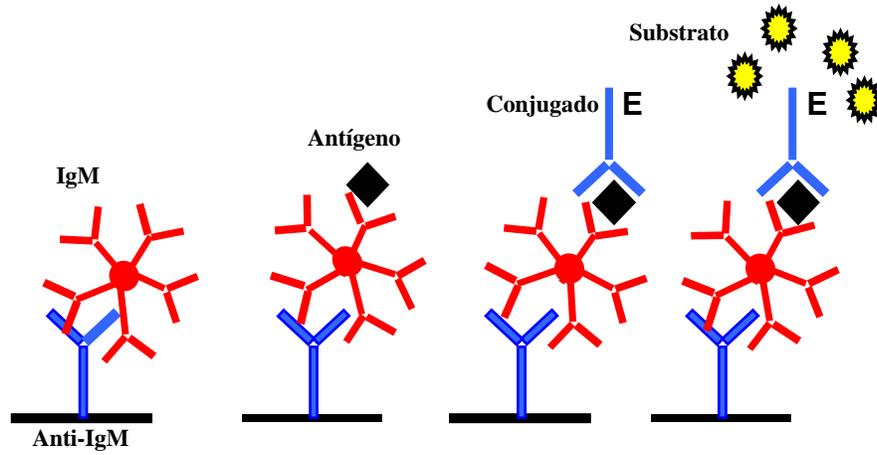


Figura 3.1. ELISA de captura para la detección de anticuerpos IgM.

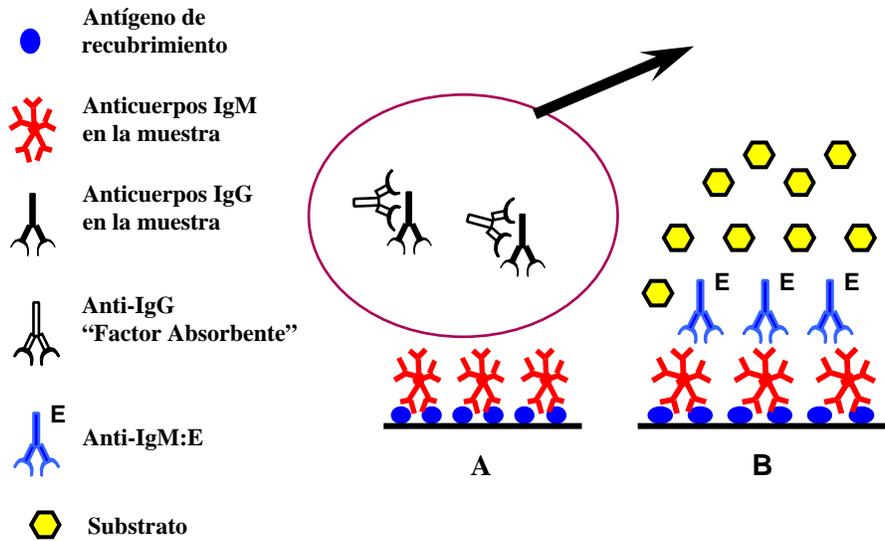


Figura 3.2. ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgM.

Pasos para la optimización de un ensayo:

1. Preparación de estándares y controles.
2. Evaluación del recubrimiento o sensibilización de la fase sólida.
3. Selección de amortiguadores.
4. Selección de los reactivos de detección.
5. Evaluación de las condiciones de reacción.

Preparación de estándares y controles

Este es un paso crucial, debemos garantizar la obtención de estándares y controles homogéneos para la optimización del ensayo y la ulterior evaluación de inmunógenos vacunales, para ello es recomendable prepararlos a partir de mezclas de suero obtenidas de al menos cincuenta individuos con elevados títulos de anticuerpos una vez culminado el esquema de inmunización de interés. La respuesta basal de anticuerpos en estos voluntarios debe ser negativa o al menos baja.

Debe garantizarse que los estándares y controles tengan un comportamiento paralelo a las muestras y cada vez que sea posible deben ser referenciados contra ensayos *in vivo* que midan protección. El rango seleccionado de la curva estándar debe tener un adecuado ajuste lineal, presentando coeficientes de determinación (R^2) $\geq 0,98$ (Figura 3.3) e incluir el valor mínimo de protección si es conocido. En el ejemplo las diluciones seleccionadas corresponden a la línea con marcadores cuadrados. Se requiere además alcanzar una buena discriminación entre el mayor punto de la curva y los sueros negativos.

Una mención particular para la estabilización de los sueros de referencia que reviste una especial importancia para la fiabilidad de los resultados. La congelación y descongelación reiteradas, provoca la desnaturalización de las proteínas. Se han empleado distintos procedimientos estabilizadores, entre los que se destaca la liofilización con y sin aditivos, o el uso de azúcares, polialcoholes, aminoácidos o proteínas de diferentes especies para la conservación en medio líquido. Sugerimos el empleo de albúmina sérica humana al 6%, que brinda una concentración similar a la del suero y una menor modificación de la matriz al usar sus propios constituyentes. Deben incluirse, además, agentes antibacterianos como la azida sódica o el timerosal.

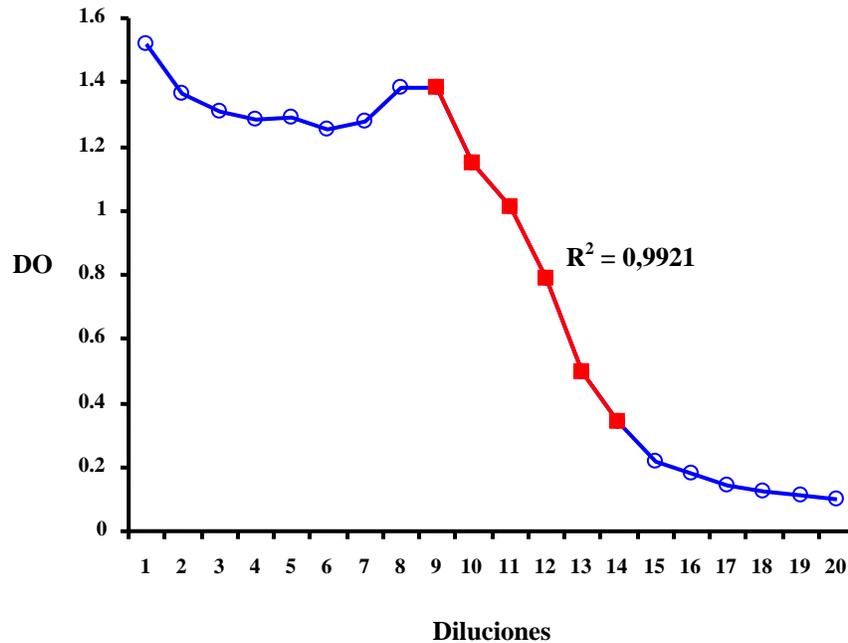


Figura 3.3. Múltiples diluciones del suero estándar para seleccionar el rango óptimo.

El suero control positivo debe ubicarse en la zona central de la curva, usualmente la de mayor pendiente. Algunos autores recomiendan el uso de controles de alta, media y baja concentración, este último en la zona del valor mínimo de protección si es conocido. Los controles negativos son útiles fundamentalmente en el proceso de estandarización. Para estimar el rango de los sueros controles deben realizarse al menos quinientas réplicas; una vez estimada la normalidad de la distribución, el rango se define como el valor promedio ± 2 desviaciones estándar.

En el caso de los ensayos cualitativos debe determinarse el valor de corte, definido de acuerdo con nuestros intereses, teniendo en cuenta la sensibilidad y especificidad. Generalmente los métodos de pesquiasaje requieren la máxima sensibilidad y los confirmatorios, una elevada especificidad. Para determinar el valor de corte deben usarse paneles de muestras positivas y negativas, y debe siempre referirse a los controles positivos o a los negativos. Recomendamos su cálculo basado en el método del valor límite, en el que se

calcula para cada muestra el cociente muestra/control, o la diferencia muestra-control, normalizando de esta forma los valores obtenidos en diferentes corridas. El valor de corte será el que alcance la sensibilidad y especificidad deseada. En un ejemplo ideal (Figura 3.4), el cociente muestra/control negativo = 2,5 alcanza una sensibilidad y especificidad del 100%, de tal forma por simple despeje matemático, definimos como valor de corte 2,5 veces el promedio de los controles negativos en cada ensayo particular. Por lo tanto, toda muestra cuyo valor sea igual o superior a 2,5, será considerada por lo tanto reactiva o positiva.

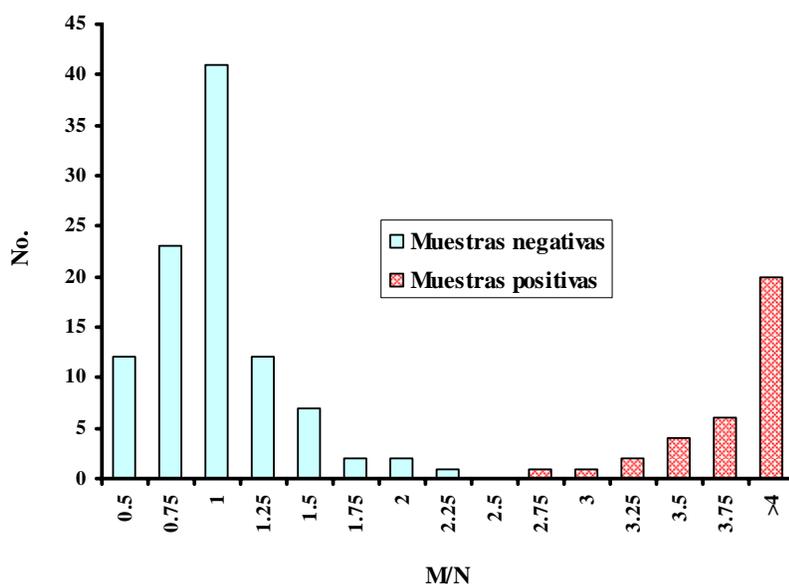


Figura 3.4. Distribución de frecuencias en paneles de muestras positivas y negativas, mostradas como el cociente entre las muestras y el promedio de los controles negativos (M/N).

Evaluación del recubrimiento o sensibilización de la fase sólida:

Selección del soporte sólido

La unión de antígenos o anticuerpos a un soporte sólido puede hacerse de forma covalente o por adsorción no-covalente. La unión covalente elimina de hecho la posible disociación de las moléculas fijadas y facilita su orientación

adecuada, es muy útil cuando se usa material biológico de difícil adsorción, como carbohidratos y ácidos nucleicos. Sin embargo, los materiales diseñados para establecer este tipo de enlaces son caros y en la mayoría de los casos puede alcanzarse una adecuada adsorción no-covalente. En los ELISAs es extremadamente importante el paso de sensibilización de la fase sólida. En estos ensayos hay una proporcionalidad entre el número de moléculas inmovilizadas en la primera capa sobre la matriz sólida y las que reaccionan en la segunda capa, esta proporcionalidad continúa en capas posteriores y es responsable de la sensibilidad del ensayo. Además, es vital que la orientación de las moléculas inmovilizadas sea la correcta, por ejemplo, los anticuerpos deben unirse por el fragmento Fc para permitir una interacción adecuada con el antígeno; son también requisitos necesarios que estas moléculas presenten una disociación mínima, mantengan la actividad biológica y se alcance en el ensayo un bajo valor de fondo. El número de moléculas adsorbidas en la primera capa es aproximadamente de 100 ng/cm^2 en plásticos normales; cuando se usan superficies de alta captación puede incrementarse alrededor de 400 ng/cm^2 . La adsorción de las biomoléculas depende, principalmente, de las débiles pero numerosas fuerzas de atracción intermoleculares, basadas en polaridades eléctricas intramoleculares; alternativas y estacionarias, mediadas principalmente en el primer caso por grupos hidrofóbicos y en el segundo, por grupos hidrofílicos.

Se usan un gran número de materiales y formas. Las matrices sólidas particuladas, como perlas o micropartículas, las membranas y los formatos de tubos, tiras o placas tipo “estrella”, generalmente brindan una mayor sensibilidad y detectabilidad al aumentar la superficie de contacto y posibilitan disminuir los tiempos de reacción; sin embargo, la mayor parte de estos formatos son menos apropiados para el procesamiento de un elevado número de muestras. Existen otros formatos adecuados para el diagnóstico individual como las tiras y palillos reactivos. Los tubos y sobre todo las microplacas, con sus múltiples variantes, siguen siendo las de elección en los ELISAs cuando se desea procesar un elevado número de muestras.

Aunque existe un gran número de materiales: cloruro de polivinilo, polipropileno, acrílico, nitrocelulosa, entre otros, el poliestireno es el más usado por su excelente calidad óptica, por facilitar enlaces estables y su dureza mecánica. Para la lectura colorimétrica se usa poliestireno transparente; si es fluorimétrica, blancos o negros. Las microplacas de poliestireno pueden ser estándares o de alta captación. Estas últimas, además

de los grupos hidrofóbicos característicos de este material, tienen una fina red de grupos hidrofílicos capaces de establecer puentes de hidrógeno. La alta energía requerida para la introducción de átomos de oxígeno, nitrógeno u otros grupos polares al poliestireno puede ser producida por irradiación *gamma* o *beta*. Esta modificación produce una superficie con excelentes propiedades para la captación de moléculas hidrofílicas (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Poliestireno de elección según su preferencia para la adsorción de Biomoléculas.

Alta captación	Estándar
Proteínas y péptidos*	Proteínas y péptidos**
Glicoproteínas	Lipoproteínas
Poliglicanos	Lípidos

* Predominio de aminoácidos hidrofílicos.

** Predominio de aminoácidos hidrofóbicos.

En los antígenos de pobre adsorción, para los cuales el material de elección debe facilitar la unión covalente, pueden usarse también plásticos convencionales, y la inmovilización puede lograrse a través de moléculas puentes, como la albúmina sérica bovina o humana metilada y otras sustancias policatiónicas como la poli-L-lisina. En el caso de los péptidos sintéticos puede también alcanzarse mediante extensión del extremo N-terminal con grupos que faciliten su adsorción.

Inmovilización del material biológico

La inmovilización del material biológico que se debe emplear depende principalmente de:

1. Las características del soporte sólido. Composición química y forma.
2. Propiedades de la biomolécula. La velocidad de difusión disminuye proporcionalmente al aumento del volumen hidrodinámico; por consiguiente, la velocidad y la adsorción de las grandes moléculas es menor que las pequeñas. Según sea su hidrofobicidad y el tipo de soporte sólido, se favorecerá o no la adsorción tal y como hemos señalado.

3. Concentración de la biomolécula. A mayor concentración se incrementa la adsorción. Concentraciones entre 1-10 $\mu\text{g/mL}$ son generalmente suficientes, aunque deben estimarse en cada caso. Las elevadas concentraciones pueden provocar una disminución de la sensibilidad y la detectabilidad del ensayo (efecto “gancho”) por la formación de sobrecapas de biomoléculas débilmente adsorbidas, que se liberan fácilmente en los pasos subsiguientes inhibiendo los inmunorreactantes en la fase líquida.
4. Tiempo y temperatura. Son directamente proporcionales a la adsorción, en el segundo caso debido al aumento de la velocidad de difusión que incrementa la interacción entre la biomolécula y la fase sólida, se requiere también un tiempo apropiado para lograr una inmovilización efectiva; sin embargo, cuando se prolonga demasiado el tiempo o se aumenta excesivamente la temperatura, puede disminuir la adsorción por desnaturalización de las biomoléculas. Hay una relación inversa entre tiempo y temperatura que debe ser controlada estrechamente, incubaciones de 2-4 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ son equivalentes a 16-20 horas a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Generalmente esta última combinación es satisfactoria, aunque el tiempo y la temperatura óptimos son particulares para cada biomolécula. La adsorción de células puede requerir su desecado durante 16-20 horas entre $33-37\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferentemente con una humedad relativa menor del 50%.
5. Amortiguadores. La adsorción es más fuerte cerca del punto isoeléctrico de la biomolécula, sin embargo, el amortiguador de elección se determina experimentalmente. El más común y de mejores resultados sigue siendo el amortiguador carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Entre otros amortiguadores tenemos: tris 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 8,5; tris 0,05 M, pH 8,0; fosfato de sodio 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2; citrato 0,1 M, pH 6,0; el clásico amortiguador fosfato salino 0,15 M, pH 7,2 e, incluso, la propia agua desionizada puede ser la seleccionada. No deben emplearse amortiguadores con elevada fuerza iónica, detergentes, otras moléculas que puedan competir con los sitios de unión a la fase sólida o aumentar la viscosidad de la solución.
6. Agitación. Facilita el encuentro entre la biomolécula y la superficie. Mediante este procedimiento son menos críticos otros factores como la viscosidad de la solución y la temperatura.

Procedimiento

Definimos como la concentración óptima de recubrimiento a una temperatura, tiempo y amortiguador definidos, como aquella con la que se alcance la meseta de mayor señal con los sueros estándares o controles positivos y la menor para los sueros negativos y el blanco reactivo, resultado que debe repetirse en una serie de diferentes concentraciones cercanas, entre las cuales no deben encontrarse diferencias según la prueba de análisis de varianza. En la práctica se prefiere recubrir a un ligero exceso de material biológico siempre y cuando se cumplan las condiciones anteriores. En el ejemplo (Figura 3.5), la concentración de elección sería sobre los 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

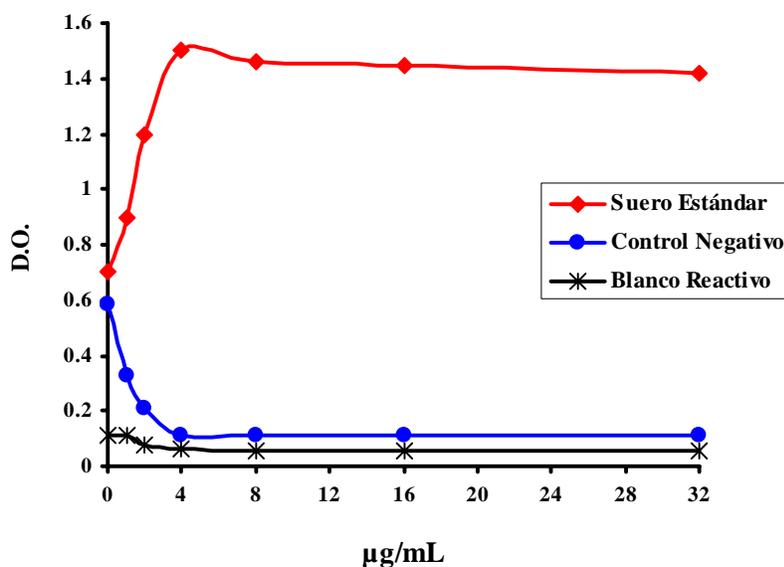


Figura 3.5. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento.

Tradicionalmente se han empleado sólo sueros positivos para determinar la concentración óptima de recubrimiento; sin embargo, este procedimiento no tiene en cuenta que puede alcanzarse una elevada señal, sobre todo en biomoléculas de alto peso molecular, sin una real saturación de la fase sólida, debido al impedimento estérico, por una parte en la propia etapa de

sensibilización y por otra en el paso de captura de los anticuerpos presentes en las muestras. Los espacios libres pueden ser ocupados por inmunoglobulinas no específicas o el conjugado, lo que aumenta el valor de fondo, incidiendo negativamente en la detectabilidad del ensayo. El procedimiento descrito permite alcanzar una mayor saturación, ya que no sólo valora la máxima señal alcanzada con los sueros positivos, sino la menor con los negativos y el blanco reactivo, de esta forma verificamos la ocupación de los espacios libres por las propias biomoléculas de cada ensayo, haciendo innecesario en muchas ocasiones un procedimiento de bloqueo. Cuando es necesario debe hacerse con una molécula inerte como seroalbúmina bovina, gelatina, suero fetal de ternera o de otra especie, caseína o leche descremada, aunque estas dos últimas deben evitarse cuando se evalúan sueros para enfermedades autoinmunes por el riesgo de anticuerpos anticaseína. Las concentraciones, tiempo y temperatura usados son muy variables. El tween 20, además de detergente, es un eficaz agente bloqueador, por lo que habitualmente es suficiente con los lavados usados para eliminar el exceso de reactantes en el recubrimiento.

Selección de amortiguadores

Además de los usados en el recubrimiento, los amortiguadores se emplean para la dilución de los inmunorreactantes y los lavados. Generalmente tienen un pH neutral y los usados como diluyente contienen moléculas con función estabilizante y bloqueadora. Se sugiere que contengan todas las moléculas que han sido usadas previamente, excepto las que queremos medir, también deben contener las correspondientes al conjugado. Por ejemplo, en un ensayo indirecto en el que hemos bloqueado con seroalbúmina bovina y en el que usamos un conjugado de cabra anti-IgG humana/enzima, debemos añadir seroalbúmina bovina y suero de cabra en el diluyente de la muestra y del conjugado. Es recomendable usar detergentes en los reactantes secundarios.

Ejemplos de amortiguadores:

- Amortiguador fosfato salino 0,15 M, pH 7,2 – 7,4
- Amortiguador tris 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,8
- Amortiguador tris 0,015 M, NaCl 0,15 M, pH 7,8

Dentro de los detergentes el tween-20 es el de elección al 0,05% (v/v), sobre todo cuando se usa material de alta captación.

Selección de los reactivos de detección

Se han usado diferentes enzimas en el conjugado y en los últimos años se ha incrementado el uso de sistemas cíclicos enzimáticos de amplificación y substratos fluorescentes y quimioluminiscentes, todos en aras de aumentar la sensibilidad de los ensayos. Las enzimas más ampliamente usadas siguen siendo la peroxidasa y la fosfatasa alcalina, con substratos colorimétricos para el ELISA y de depósito en el caso de ensayos sobre membrana de nitrocelulosa.

En el Capítulo 2 se describen con más detalle las enzimas y substratos empleados.

Evaluación de las condiciones de reacción

En la interacción antígeno-anticuerpo participan los mismos factores que intervienen en el recubrimiento. El pH, la fuerza iónica, la temperatura y los solventes orgánicos influyen en la estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo.

La formación de complejos generalmente se incrementa con la temperatura. Las más usadas son la temperatura de laboratorio (20-25 °C) y 37 °C. El uso “estándar” de esta última temperatura no tiene que ser universalmente adecuado, ya que en los llamados anticuerpos “fríos” la formación de complejos puede afectarse, aunque la producción de estos anticuerpos no es lo esperado en respuesta a inmunógenos vacunales.

El tiempo de reacción óptimo para muestras y conjugado se determina por la mayor discriminación entre el estándar o el control positivo y el control negativo, según la prueba de análisis de varianza. Debe tenerse en cuenta que un excesivo tiempo de reacción puede incrementar las uniones inespecíficas, sobre todo en los ensayos indirectos, en los que ordinariamente son suficientes condiciones de reacción de una hora a 37 °C en los pasos de muestra y conjugado, así como de 30 minutos para el substrato a 20-25 °C.

De forma similar se procede para determinar la concentración de trabajo (dilución) de muestras y conjugado. Cuando se requiere usar diferentes diluciones de una muestra, debe demostrarse un adecuado paralelismo y especificidad. Para definir la dilución debe tenerse en cuenta aquella en que se detecte la mayor parte de las muestras pre y postinmunización.

La estandarización de un inmunoensayo es un proceso dinámico, en el que las fronteras entre este procedimiento y el de validación, que veremos en el Capítulo 4, no están claramente definidas. Una buena estandarización es necesaria para obtener buenos resultados en el proceso de validación, de este puede derivarse la necesidad incluso de la reestandarización del método.

Contar con una buena herramienta de evaluación es un requisito imprescindible para los ensayos preclínicos y clínicos de vacunas.

Bibliografía

1. Aggerbeck H, Norgaard-Pedersen B, Heron I. "Simultaneous Quantitation of Diphtheria and Tetanus Antibodies by Double Antigen, Time-Resolved Fluorescence Immunoassay", *Journal of Immunological Methods*, 1996; 190:171-83.
2. Andersen J, Berthelsen L, Lind I. "Measurement of Antibodies against Meningococcal Capsular Polysaccharide B and C in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay towards an Improved Surveillance of Meningococcal Disease", *Clin Diag Lab Immunol*, 1997; 4:345-51.
3. Ann NQ, Hong HA, Nhon TN, Think ND, Van NT, Hendriks J. "Tetanus Antibodies Measured by the Toxin Binding Inhibition Test (ToBI) in Mothers and Children in the Neonatal Tetanus Program in Vietnam", *Dev Biol Stand*, 1999; 101:247-53.
4. Back J, Oakenfull D, Smith M. "Increased Thermal Stability of Proteins in the Presence of Sugars and Polyols", *Biochemistry*, 1979; 18:5191-6.
5. Beristain CN, Rojkin LF, Lorenzo LE. "Evaluation of a Dipstick Method for the Detection of Human Immunodeficiency Virus Infection", *J Clin Lab Anal*, 1995; 9:347-50.
6. Bonin E, Tiru M, Hallander H, Bredberg-Raden U. "Evaluation of Single and Dual Antigen Delayed Fluorescence Immunoassay in Comparison to an ELISA and the in Vivo Toxin Neutralisation Test for Detection of Diphtheria Toxin Antibodies", *J Immunol Methods*, 1999; 230:131-40.
7. Borrow R, Richmond P, Kaczmarek EB, Iverson A, Martin SL, Findlow J, et al. "Meningococcal Serogroup C-Specific IgG Antibody Responses and Serum Bactericidal Titres in Children Following Vaccination with a Meningococcal A/C Polysaccharide Vaccine", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2000; 28:79-85.
8. 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.

9. Engvall E. and Perlman P. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labelled Anti-Immunoglobulin in Antigen Coated Tubes", *J Immunol*, 1972; 109:129-35.
10. Esser P. "Blocking Agent and Detergent in ELISA", *Nunc Bulletin*, 1991, June 9:1-4.
11. Esser P. "Principles in Adsorption to Polystyrene", *Nunc Bulletin*, 1988;11(6): 1-5.
12. Galazka AM. *The Immunological Basis for Immunization Series.Module 3. Tetanus*. World Health Organization, Geneva, 1996.
13. Gheesling LL, Carlone GM, Pais LB, Holder PF, Maslanka SE, Plykaytis BD, et al. "Multicenter Comparison of *Neisseria Meningitidis* Serogroup C Anti-Capsular Polysaccharide Antibody Levels Measured by a Standardized Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", *J Clin Microbiol*, 1994; 32:1475-82.
14. Harlow E, Lane D, editors. "Immunoassays", en: *Antibodies. A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1998, pp. 553-612.
15. Labsystems Research Centre. *Studies on Immobilization of Biological Materials. Enhanced Adsorption to Modified Polystyrene*, Finland, Labsystems, 1998.
16. Leinonen M, Frasch CE. "Class-Specific Antibody Response to Group B *Neisseria Meningitidis* Capsular Polysaccharide: Use of Poly-L-Lysine Precoating in an Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay", *Infect Immun*, 1982; 38:1203-7.
17. Loomans EE, van-Ettekoven AP, Bloemers HP, Schielen WJ. "Direct Coating of Poly (lys) or Acetyl-Thio-Acetyl Peptides to Polystyrene: The Effects in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", *Analytical Biochemistry*, 1997; 248:117-29.
18. Lovborg U. *Guide to Solid Phase Immunoassays*, Roskilde, Denmark, Nunc, 1984.
19. Martínez JC, Ochoa R, Cruces A, Fajardo EM, Alvarez E, Ferriol X, et al. "Validation of an ELISA for the Quantitation of Diphtheria Antitoxin in Human Serum", *Biotecnología Aplicada*, 2000; 17:183-86.
20. Martínez JC, Ochoa R, Estrada E, Riverón L, González M, Ferriol X, et al. "Validación de un ELISA para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas humanas anti polisacárido capsular de *Salmonella typhi*", *VacciMonitor*, 1999; 8(8):7-10.
21. May K, Evans M, Richards I, inventors. "Immuncromatography. UK Patent Application GB 2204398 A", 1988, Nov. 9.
22. Nerey M, Ochoa R, Martínez JC, Licea T, Ferriol X, García AM, et al. "Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG humana anti-polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C", *Biotecnología Aplicada*, 1999; 16:113-15.

23. Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X, Blanco R, et al. "Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas", *VacciMonitor*, 2000; 9(1):17-20.
24. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R, et al. "Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas", *VacciMonitor*, 2000; 9(3):13-8.
25. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R, et al. "Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas", *VacciMonitor*, 1999; 8(10):9-13.
26. Ochoa R, Nerey M, Martínez JC. "Use of Poly-L-Lysine Precoating in an ELISA for the Detection of Antibodies against Serogroup C *Neisseria Meningitidis* Capsular Polysaccharide", *Biotecnología Aplicada*, 1999;16:173-5.
27. Ochoa R. "A New Format ELISA for the Detection of HBsAg", *Biotecnología Aplicada*, 1998; 15:250-3.
28. Ochoa R. "Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos", Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias Médicas, Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, 2002.
29. Plikaytis BD, Carlone GM, Turner SH, Gheesling LL, Holder PF. "Program ELISA User's Manual", Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, 1993.
30. Rodríguez L, Balmaseda A, Bravo J, Trujillo J, Martínez L, Ochoa R, et al. "Validación de un ultramicroELISA de detección de anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B", *Rev. Cubana Med Trop*, 1996; 48(1):45-9.
31. Steinitz M, Baraz L. "A Rapid Method for Estimating the Binding of Ligands to ELISA Microwells", *Journal of Immunological Methods*, 2000; 238:143-50.
32. Steinitz M. "Quantitation of the Blocking Effect of Tween 20 and Bovine Serum Albumin in ELISA Microwells", *Analytical Biochemistry*, 2000; 282:232-8.
33. Suzuki N, Quesenberry MS, Wang JK, Lee RT, Kobayashi K, Lee YC. "Efficient Immobilization of Proteins by Modification of Plate Surface with Polystyrene Derivatives", *Analytical Biochemistry*, 1997; 247:412-6.
34. Tanaka Y, Noda Y, Kobayashi M, Yamada Y, Birao K. "Microvolume Blood-Sampling Device with Low Hemolysis and High Consistent Yield of Serum Components", *Clin Chem*, 2001; 47:1829-35.
35. Tijssen P. "Kinetics and Nature of Antibody-Antigen Interactions", en: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Amsterdam, London, New York, Tokyo, Elsevier, 1993:123-49.
36. Tijssen P. "Non-Immunologic Molecular Recognition Systems Used in Immunoassays", en: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors. *Laboratory*

Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas
mediante técnicas inmunoenzimáticas

- Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Amsterdam, London, New York, Tokyo, Elsevier, 1993:21-37.
37. Tijssen P. "Outline of the Strategies for Enzyme Immunoassays", en: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Amsterdam, London, New York, Tokyo, Elsevier, 1993:9-20.
 38. Tijssen P. "The Immobilization of Immunoreactants on Solid Phases", en: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Amsterdam, London, New York, Tokyo, Elsevier, 1993:297-328.
 39. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Nuffield Laboratories of Comparative Medicine, Dynatech Europe, Borough House, Guernsey, UK, ed., London, 1979.

Capítulo 4

Validación de los inmunoensayos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas

Los inmunoensayos empleados en los estudios preclínicos y clínicos para la evaluación de la inmunogenicidad de vacunas requieren de una adecuada consistencia en sus resultados, de tal forma que pueda compararse la inmunogenicidad de una vacuna dada en diferentes investigaciones. Esto tiene particular relevancia cuando se analiza la consistencia clínica.

La apropiada estandarización del ensayo analítico, seguido de la validación del método y la homogeneidad de los reactivos químicos y biológicos a lo largo de los diferentes estudios, son elementos imprescindibles para alcanzar óptimos resultados.

Para estandarizar un inmunoensayo, se requiere determinar las condiciones de trabajo óptimas de los reactivos químicos y biológicos, la temperatura y el tiempo de incubación en cada etapa, la dilución idónea de las muestras y la preparación de estándares y controles, entre otros aspectos (Capítulo 3).

Realmente la separación entre estandarización y validación en cualquier técnica es puramente convencional. Con una adecuada estandarización se alcanzan indicadores óptimos en el ensayo. Por otra parte, los distintos indicadores analizados en el proceso de validación no sólo nos permiten calificar la técnica estandarizada, sino que nos orientan sobre dicho proceso. De sus resultados podemos concluir la necesidad de la modificación o reestandarización del método.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos.

En general se consideran tres tipos de validación:

1. Validación prospectiva: La que se realiza a técnicas nuevas.
2. Validación retrospectiva: Para técnicas no validadas anteriormente y de las que se tiene documentación suficiente para probar la calidad del método.

3. Revalidación: Cuando hay cambios significativos en las condiciones originales del método o cuando este lleva largo tiempo utilizándose.

Los estudios de validación pueden agruparse según sean los ensayos: cuantitativos o cualitativos.

Son definidos como cuantitativos los que usan curvas de calibración para calcular la concentración o actividad de las muestras estudiadas.

Algunas técnicas que usan una escala discontinua se denominan semicuantitativas; sin embargo, si usan estándares de calibración es mejor evitar ese término intermedio y analizarlas como cuantitativas.

Son cualitativos aquellos ensayos que no ofrecen un resultado numérico, sino que es dado en forma binaria; por ejemplo, positivo o negativo.

Procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos

En las técnicas cuantitativas usadas para evaluar la inmunogenicidad de vacunas, los indicadores fundamentales que se deben evaluar son (Figura 4.1):

- Precisión
- Exactitud
- Linealidad de la curva estándar
- Rango o intervalo
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Selectividad
- Tolerancia o fortaleza
- Robustez

Debe conocerse que no existe un acuerdo universal acerca de la definición de algunos indicadores y, a su vez, el mismo indicador puede ser determinado por diferentes métodos.

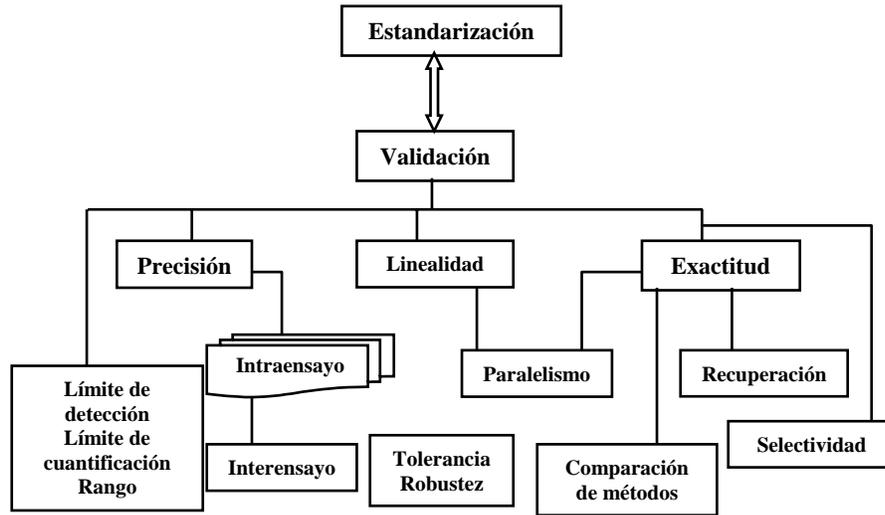


Figura 4.1. Diagrama de flujo para la validación de ensayos cuantitativos.

Precisión

La precisión de un método se define como la dispersión de los datos obtenidos para una muestra procesada varias veces. La precisión se expresa como el coeficiente de variación (CV). Este es la desviación estándar dividido por el valor promedio de los replicados de una muestra, expresado habitualmente en porcentaje.

Puede clasificarse en:

1. Precisión intraensayo: Es el que se obtiene cuando se procesan varias réplicas de diferentes muestras en un mismo ensayo; es decir, la precisión entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones (repetibilidad). Deben analizarse muestras que hayan sido procesadas independientemente; desde la preparación hasta los resultados finales, y usarse al menos dos diferentes concentraciones del analito –alta y baja–, aunque es preferible añadir una muestra de concentración media, o más muestras si se quiere alcanzar una mejor evaluación. Una de estas debe tener una concentración próxima al valor de decisión clínica; otra, un valor cercano al límite superior del

intervalo analítico, y la tercera un valor cercano al límite inferior. El número de repeticiones recomendado varía desde cinco a diez. Hemos obtenido óptimos resultados analizando al menos una muestra para cada segmento de la curva de calibración; así, en una curva de seis puntos, usaremos cinco muestras con diez replicados de cada una.

2. Precisión interensayo: Es la que se obtiene entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones. Se evalúan muestras con diferentes concentraciones, tal y como anteriormente describimos. De cada muestra se hacen entre tres a diez replicados en un ensayo dado, repitiendo este procedimiento al menos dos veces en días diferentes para un total de tres ensayos. La precisión interensayo permite también explorar la reproducibilidad del trabajo de un laboratorio durante un período de tiempo determinado, para evaluar la ejecución entre los técnicos, la variación entre laboratorios o lotes de reactivos. Algunos autores designan como reproducibilidad al estudio interlaboratorio que describe la máxima variabilidad de un procedimiento analítico, y definen como precisión intermedia o interensayo la que expresa las variaciones dentro del laboratorio. Otros calculan la precisión interensayo a partir de los valores promedios de los ensayos, y definen como precisión total la calculada con todos los valores obtenidos para una muestra, dentro y entre los ensayos.

Los inmunoensayos enzimáticos, por su propio carácter, son menos precisos que las técnicas químicas, físicas o bioquímicas, por lo que el criterio de validación es menos riguroso. El coeficiente de variación [$CV = (\text{desviación estándar/promedio}) \times 100$] no debe superar el 10% en la prueba de precisión intraensayo y el 20% en la interensayo; son óptimos los inferiores al 5% y al 10% respectivamente. Sin embargo, las normas vigentes de la Organización Mundial de la Salud admiten un rango entre el 5% y el 20%. No deben encontrarse diferencias significativas entre los ensayos mediante el análisis de varianza.

Exactitud

Es el grado de identidad de los valores analíticos obtenidos con cierto método y el contenido real del analito en la muestra. Indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible al verdadero valor. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña,

la exactitud es buena. Con la evaluación de este indicador se investigan los componentes que influyen en la veracidad del método (error sistemático), además de predecir la magnitud y la dirección del error.

Para evaluar la exactitud se recomienda efectuar los estudios siguientes:

1. **Ensayo de recuperación.** Evalúa la capacidad del método de recobrar una concentración exógena de analito, añadida a una muestra con concentración endógena libre de este o con baja concentración. Se expresa y calcula matemáticamente en forma de porcentajes de recuperación. Para su estudio, se puede emplear una muestra de concentración conocida que se analiza de seis a diez veces, aunque es más recomendable usar al menos tres cantidades diferentes de analito, de forma tal que se abarque el rango analítico. Al igual que en la precisión, sugerimos explorar cada uno de los segmentos de la curva de calibración.
2. **Ensayo de paralelismo o de dilución.** Este ensayo es usado también para evaluar la linealidad. Para que los resultados de este método sean válidos es esencial que el analito en el estándar y las muestras tengan un comportamiento similar; por esta razón las diluciones no deben afectar el resultado final. Con este ensayo se evalúa el efecto matriz. Se preparan al menos tres diluciones de no menos cinco muestras, cubriendo el rango analítico, y se evalúan como mínimo en triplicado.
3. **Ensayo de comparación de métodos.** La comparación con otro método de referencia tiene como objetivo determinar la equivalencia de métodos analíticos diferentes y permite explorar, además de la exactitud, la precisión. Debe tenerse en cuenta que si se aprecian diferencias, estas pueden ser causadas por las propias limitaciones del método, por lo que estos estudios nunca deben emplearse de forma aislada para evaluar el error sistemático. Este estudio se puede llevar a cabo a concentración única del analito o preferentemente con varias concentraciones diferentes que abarquen el rango analítico. El tamaño de la muestra debe ser adecuado para permitir el estudio estadístico, y diferirá en función del modelo estadístico empleado para el tratamiento de datos. Algunos autores recomiendan estudiar al menos veinticinco muestras y, de ser posible, procesarse en diferentes series. Debe tenerse en cuenta la imprecisión de ambos métodos y seleccionar cuidadosamente el de referencia, que debe ser la “regla de oro”, o al menos un método de igual o superior generación, o tener características

que lo hagan especialmente necesario o insustituible, como puede ser la evaluación funcional de los efectores de la respuesta inmune inducida por los inmunógenos vacunales, que correlaciona generalmente con la protección.

En los estudios de exactitud pueden usarse varios métodos de cálculo, para lo cual se hacen los siguientes tratamientos a los datos:

1. Porcentaje de recuperación.
2. Demostración de que no existen diferencias significativas entre el valor hallado y el valor considerado verdadero.
3. Por análisis de regresión.

El porcentaje de recuperación es un procedimiento sencillo y eficaz para evaluar la exactitud. La recuperación se define como el error (%) entre el valor observado u obtenido y el real o esperado (valor obtenido en el ensayo x 100/valor esperado) y debe encontrarse entre el 90% y 110%. Tomemos como ejemplo (Tabla 4.1) dos muestras positivas del analito evaluado, las que se diluyen (volumen/volumen) con una muestra libre del mismo. Se observa que con la primera se obtienen resultados inexactos.

Tabla 4.1. Exactitud medida por un ensayo de recuperación.

Muestras sin diluir	Valor esperado	Valor obtenido	Recuperación (%)
160	80	60	75
80	40	42	105

Muestras sin diluir = La concentración calculada en la muestra.

Valor esperado = Es la concentración teórica o real. En este caso: Muestras sin diluir/2.

Valor obtenido = Es la concentración calculada en el ensayo.

Recuperación = (Valor obtenido x 100)/Valor esperado.

Cuando se usa una muestra de concentración única, los resultados pueden expresarse en porcentaje y se pueden comparar las series mediante la prueba de Fisher, seguido de la prueba t de Student para determinar si hay o no diferencias entre el valor medio hallado y el considerado verdadero.

En el caso que se analicen varias muestras de concentraciones diferentes, se utiliza la prueba C de Cochran u otra similar para verificar la

homogeneidad de las varianzas, y se calcula la recuperación. Para determinar si la exactitud es aceptable, puede emplearse una prueba t de Student para muestras pareadas.

La exactitud puede estudiarse calculando la recta de regresión entre los valores teóricos y los obtenidos en el ensayo, previa verificación de la homogeneidad de las varianzas para cada punto de la curva con la prueba C de Cochran y evaluación del modelo lineal con la prueba de análisis de varianza. El coeficiente de determinación (R^2) debe ser $\geq 0,98$ y el de correlación (r) $\geq 0,99$. Para confirmar si la recuperación es satisfactoria o no, se aplica la prueba t de Student. En el ensayo de comparación de métodos, a medida que los coeficientes y la pendiente se acerquen a 1 y el intercepto tienda a 0 serán más semejantes el método evaluado y el de referencia (Figura 4.2).

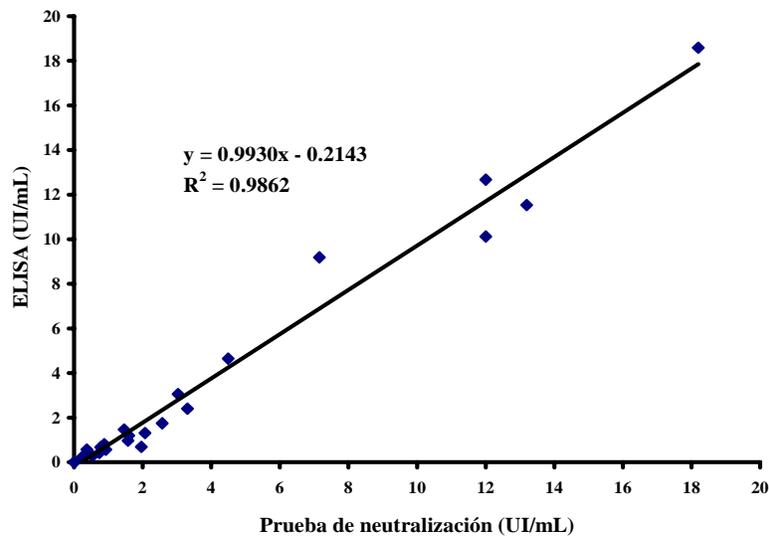


Figura 4.2. Análisis de regresión lineal entre los valores de actividad de anticuerpos obtenidos por ELISA y una prueba de neutralización *in vivo* empleada como referencia.

El CV es también empleado en los ensayos de dilución. Se basa en que al diluir una muestra de concentración conocida y luego de corregida por el factor de dilución, los resultados deben ser idénticos dentro del error experimental, por lo que el CV no debe superar el 10%.

Linealidad

Se entiende por linealidad, la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado. Se prefiere hablar de comportamiento lineal, pues está claro que en ensayos biológicos, a diferencia de muchos químicos, no existe *per se*, por lo que se emplean diversos métodos para linealizarla, como describiremos en el Capítulo 5. El empleo de curvas con varios puntos no sería necesario si el ajuste fuera lineal, en el que dos puntos son suficientes. En la mayor parte de los ensayos biológicos se necesita un análisis de regresión polinomial que valore más eficazmente el ajuste de la curva.

Dentro del término linealidad se incluye la proporcionalidad entre la concentración de analito y respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de analito para los cuales el método es satisfactorio. También se relaciona con la sensibilidad de calibrado o cociente diferencial entre la señal medida y la concentración de analito, y es igual al valor de la pendiente de la curva de calibración a una concentración determinada.

Se puede evaluar con los estudios siguientes:

1. **Ensayo de paralelismo.** Descrito anteriormente. Además, en este caso pueden emplearse muestras con concentraciones de analito sobre el rango analítico y las diluciones necesarias para evaluar la curva estándar. Se calcula el porcentaje de recuperación y el CV con las concentraciones corregidas por el factor de dilución, así como la recta de regresión, R^2 y r con los valores sin ajustar (Figura 4.3).
2. **Mezcla de pares de muestras con altas y bajas concentraciones.** Pueden usarse al menos cinco pares de muestras. Después de analizar cada muestra de forma individual y la mezcla respectiva, como mínimo en triplicado, se determina la recuperación entre el valor calculado en el ensayo y el esperado.

El análisis de los resultados se realiza de forma similar a la descrita en los estudios de exactitud:

- El porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 90% y 110%.
- El R^2 debe ser $\geq 0,98$; $r \geq 0,99$, y el intercepto con el eje de ordenadas no debe diferir estadísticamente de cero en ajustes lineales.

- El CV de los factores de respuesta no debe ser superior al 10% en los inmunoensayos, aunque para otros tipos de ensayos de comportamiento lineal no debe exceder del 5%.

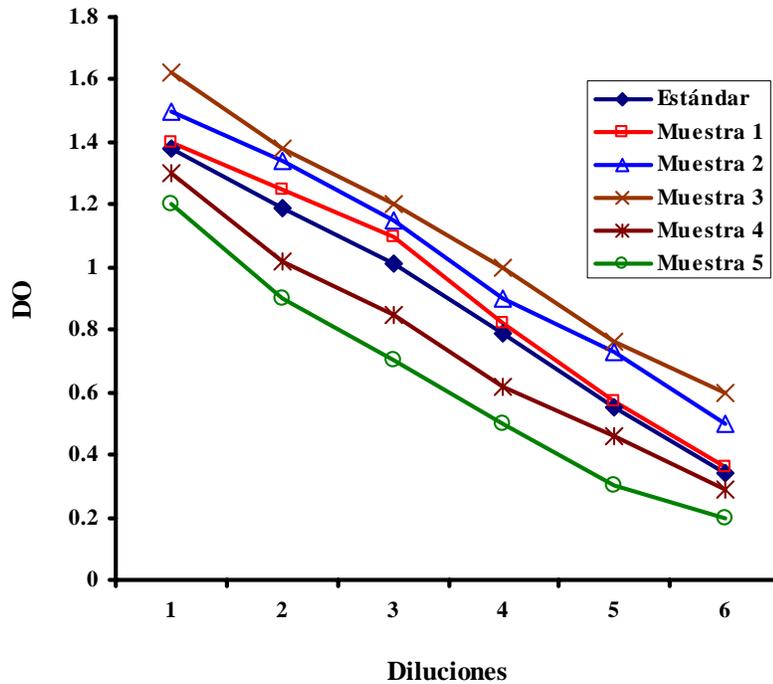


Figura 4.3. Ensayo de paralelismo. El R^2 en todas las curvas es superior a 0,99. El CV < 10%, una vez corregidos los valores por el factor de dilución.

Rango

Es el intervalo entre el mayor y el menor nivel de analito que pueden ser medidos con aceptable precisión y exactitud. Puede medirse utilizando un diseño similar al empleado en los estudios de exactitud y linealidad, lo que nos permite efectuar el estudio del rango de forma simultánea.

Una vez realizado todo este conjunto de ensayos, deberán cumplirse los criterios de exactitud y precisión en cada uno de los niveles del intervalo, así como la linealidad a lo largo del mismo.

Límite de detección o detectabilidad

Este término constituye motivo de discusión: ¿Es o no sinónimo de sensibilidad? Esta se ha definido como la cantidad mínima detectable diferenciable de cero. Como límite de detección se conoce a la menor cantidad de analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas. Es decir, la concentración mínima de una sustancia que genera una respuesta consistentemente mayor que el fondo del ensayo.

Para diferenciar el término sensibilidad utilizado en los ensayos cualitativos (proporción de muestras positivas o reactivas correctamente identificadas), se ha empleado el término sensibilidad diagnóstica para esta última, en oposición a la sensibilidad analítica.

Para obtener el límite de detección se analiza un blanco adecuado o una muestra libre del analito estudiado. Aunque se ha sugerido usar un número pequeño, entre 6 y 10, de réplicas, es preferible usar un número mayor, al menos 20. Después de verificar la normalidad de la distribución, se calcula el límite de detección, adicionándole, al valor medio de la señal obtenida, dos o tres desviaciones estándar en los ensayos con curvas de calibración con pendiente positiva, como es el caso de los ELISA indirectos, o sustrayéndole los valores correspondientes si la pendiente es negativa. La concentración correspondiente se obtiene interpolando este valor en una curva de calibración apropiada, que incluya concentraciones bajas de anticuerpos contra el analito estudiado. Una metodología sencilla para curvas lineales consiste en multiplicar dos ó tres desviaciones estándar del blanco a la concentración de una muestra estándar y dividirlo entre la densidad óptica de la muestra.

Límite de cuantificación

Es la mínima concentración del analito que puede determinarse con una precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible), mientras que el de detección es cualitativo (menor cantidad detectable).

Selectividad

Se define como la capacidad del método para determinar el analito para el cual está diseñado, exactamente y sin que interfieran otros componentes de la muestra. Es una característica intrínseca del método, que depende del principio de la reacción y del material que se investiga. Los términos selectividad y especificidad se consideran equivalentes, aunque se ha definido la selectividad como la capacidad de detectar separadamente sustancias diferentes que están presentes en una misma muestra, y especificidad la de detectar el analito sin interferencia de ningún otro compuesto.

Se evalúa ensayando muestras que contengan componentes estructuralmente cercanos al analito, u otros que pudieran interferir en los resultados, tales como hemoglobina, lípidos, anticoagulantes, inmunoglobulinas dirigidas contra otros antígenos relacionados con el estudiado y anticuerpos que reaccionen con los reactantes. En los inmunoensayos usados para detectar inmunoglobulinas específicas en ensayos clínicos de vacunas, la exactitud del método debe ser tal que sea capaz de discriminar entre las muestras tomadas antes y después de completado el esquema de inmunización y entre los grupos en los que se ha aplicado la vacuna evaluada y su control.

Tolerancia o fortaleza

Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones de operación. Para su determinación se realizan los análisis de muestras homogéneas, en diversos laboratorios, por distintos analistas, en diferentes días, entre otras condiciones.

Robustez

Investiga la influencia de pequeños cambios en las condiciones analíticas sobre la fiabilidad del método analítico, localizando los factores que originan fluctuaciones y los que necesitan una atención especial, en tanto originan variaciones significativas. Para su estudio, se introducen modificaciones en las condiciones experimentales y se observa su influencia. El estudio de robustez cobra mayor importancia en los ensayos cuyas condiciones no requieren un perfecto control.

Validación de inmunoensayos cualitativos

Los inmunoensayos cualitativos son empleados habitualmente en la evaluación de la inmunogenicidad de vacunas. Sin embargo, la evaluación de estos ensayos presenta varios problemas, ya que no todos los investigadores conocen con precisión qué rasgos los distinguen de un ensayo cuantitativo, ni cuáles indicadores deben emplearse. En una prueba cuantitativa, los resultados se dan en una distribución continua, mientras que en las cualitativas vienen dados en forma binaria: 0/1, no/sí, negativo/positivo, no seroconvierten/sí seroconvierten, etc. La mayor parte de los ensayos semicuantitativos son analizados como cualitativos y la interpretación de muchos ensayos cuantitativos usados para evaluar inmunogenicidad, se hace en términos cualitativos al determinar la seroconversión o serorespuesta inducida por una vacuna.

Un ensayo cualitativo no brinda una información numérica de los resultados, pero esto no significa que sea inferior a una prueba cuantitativa. Las aplicaciones de estos dos ensayos pueden ser diferentes y en algunas situaciones un resultado cualitativo es suficiente. Debe tenerse en cuenta que en muchos casos no existen materiales de referencia y en otros la naturaleza de los mecanismos de protección no es bien conocida, lo que limita la cuantificación de los resultados o al menos su interpretación.

Indicadores que se deben evaluar (Figura 4.4):

- Sensibilidad
- Especificidad
- Valor predictivo positivo
- Valor predictivo negativo
- Eficacia o coincidencia
- Estudios de concordancia
- Ancho de la zona “gris” como medida de precisión
- Tolerancia o fortaleza
- Robustez

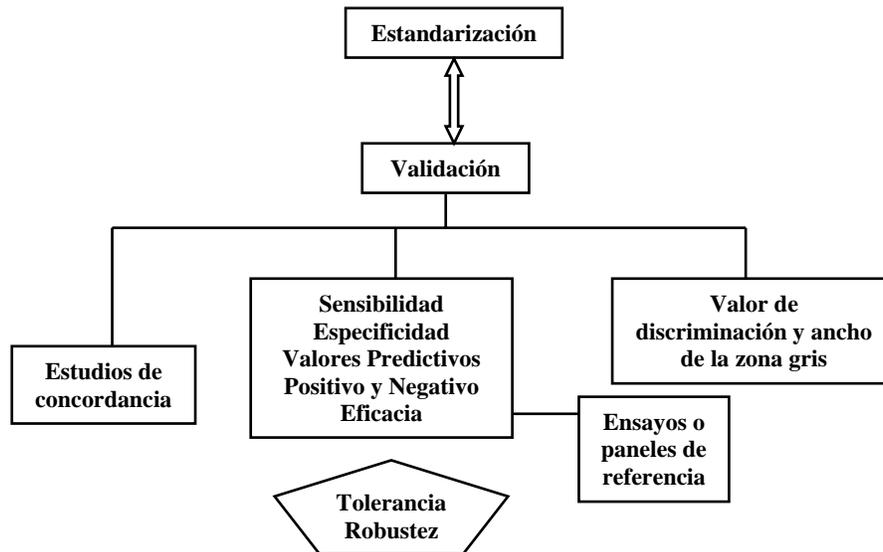


Figura 4.4. Diagrama de flujo para la validación de ensayos cualitativos.

Sensibilidad

Es definida como la proporción de muestras positivas o reactivas correctamente identificadas por la prueba empleada.

Especificidad

Proporción de muestras negativas (no reactivas) correctamente identificadas.

Después de evaluar paneles de muestras adecuadamente clasificadas o comparar nuestro ensayo con uno de referencia, se calcula la sensibilidad (positivos correctamente detectados x 100/positivos correctamente detectados + falsos negativos) y la especificidad (negativos correctamente detectados x 100/negativos correctamente detectados+falsos positivos).

Deben estudiarse al menos cien muestras representativas de la población sobre la que la técnica será usada, en las que se deben encontrar muestras con diverso grado de positividad y muestras negativas obtenidas de individuos con enfermedades relacionadas, inmunizados con otro preparado vacunal, y

entidades que pudieran condicionar falsos resultados, como enfermedades autoinmunes.

Los valores óptimos de sensibilidad y especificidad dependen de los propósitos de la técnica, idealmente 100% para ambos, aunque por lo general una elevada sensibilidad se alcanza a expensas de la especificidad y viceversa, estableciéndose habitualmente un compromiso sobre los valores deseados.

Valor predictivo positivo

Es la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente positivo, cuando el resultado de la prueba que se le practica resulta reactivo (positivos correctamente clasificados x 100/positivos correctamente clasificados + falsos positivos).

Valor predictivo negativo

Es la probabilidad que tiene un individuo de ser negativo, cuando el resultado de la prueba es no reactivo (negativos correctamente clasificados x 100/negativos correctamente clasificados + falsos negativos).

Los valores predictivos, manteniendo la sensibilidad y especificidad invariables, se modifican drásticamente de acuerdo con la prevalencia de la enfermedad, marcadores inmunológicos, genéticos, bioquímicos o de otra índole, estudiados en la población. A medida que la prevalencia disminuye, el valor predictivo negativo aumenta y el valor predictivo positivo disminuye. Esta probabilidad se calcula según el teorema de Bayes:

$$VPP = [S \times P] / [S \times P + (1 - E) \times (1 - P)]$$

$$VPN = [E (1 - P)] / [E (1 - P) + (1 - S) \times P]$$

Donde:

VPP = Valor predictivo positivo

VPN = Valor predictivo negativo

S = Sensibilidad

E = Especificidad

P = Prevalencia

Eficacia o coincidencia

Es la capacidad general de un ensayo para detectar correctamente todos los positivos y los negativos (positivos correctamente clasificados + negativos correctamente clasificados / positivos correctamente clasificados + falsos positivos + negativos correctamente clasificados + falsos negativos); es decir, una eficacia óptima se alcanzará en aquella técnica que no tenga falsos resultados positivos ni falsos negativos.

Para el cálculo de estos indicadores resulta muy útil el uso de tablas de contingencia (Tabla 4.2):

Tabla 4.2. Tabla de contingencia para el cálculo de indicadores que se deben evaluar en ensayos cualitativos.

Ensayo a evaluar	Referencia		Total
	Resultados Positivos	Resultados Negativos	
Resultados Positivos	VP (a)	FP (b)	a + b
Resultados Negativos	FN (c)	VN (d)	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

Donde:

VP = Verdaderos positivos o positivos correctamente detectados

FP = Falsos positivos

VN = Verdaderos negativos o negativos correctamente detectados

FN = Falsos negativos

$$\text{Sensibilidad} = [a / (a + c)] \times 100$$

$$\text{Especificidad} = [d / (b + d)] \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = [a / (a + b)] \times 100$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = [d / (c + d)] \times 100$$

$$\text{Eficacia} = [(a + d) / (a + b + c + d)] \times 100$$

Estudios de concordancia

Cuando se requiere la evaluación de diferentes métodos frente a un mismo panel de sueros de referencia, se usan estudios de concordancia (o eficiencia), como son la prueba de Mac Nemar y el más usado índice Kappa (Tabla 4.3):

Tabla 4.3. Índice Kappa. Procedimiento de cálculo.

Ensayo estudiado	Referencia		Total
	Resultados Positivos	Resultados Negativos	
Resultados Positivos	a	b	a + b
Resultados Negativos	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	n = a + b + c + d

Procedimiento de cálculo:

$$K = (p_o - p_e) / (1 - p_e)$$

Donde:

$$p_o = (a + d) / n$$

$$p_e = (P + N) / n$$

Concordancia en el caso de positivos $P = \left[\frac{(a + b)}{n} \times \frac{(a + c)}{n} \right] \times n$

Concordancia en el caso de negativos $N = (c + d) - \{(a + c) - P\}$

El índice de concordancia (K) puede clasificarse en cinco grupos:

Concordancia	Kappa
Deficiente	< 0,20
Regular	0,21 – 0,40
Moderada	0,41 – 0,60
Buena	0,61 – 0,80
Muy buena	0,81 – 1,00

En la práctica, cualquier valor de Kappa < 0,5 denota una baja correlación. Un problema del uso de este índice es que los valores dependen de la proporción (prevalencia) de las muestras de cada categoría, haciendo que no sea posible la comparación entre los diferentes índices procedentes de varios estudios.

La prueba de Mac Nemar es empleada cuando se comparan dos métodos con las mismas muestras y las sensibilidades y especificidades pueden aparearse.

Ancho de la zona “gris” como medida de precisión

La zona “gris” es aquella en la que los resultados no pueden clasificarse con certeza como positivos o negativos, o son claros pero no reproducibles.

El ancho de esta zona es importante y define la precisión de un ensayo cualitativo, que será mayor a medida que sea más estrecha, tal y como ocurre en el ensayo A de la Figura 4.5. Se evalúa preparando varias diluciones de una muestra de referencia, analizando al menos veinte replicados de cada dilución en orden aleatorio y registrando los resultados en positivos o negativos, según el valor de corte definido para el ensayo. El valor de discriminación corresponderá a la dilución en la que se obtenga el 50% de resultados positivos y la zona gris se extenderá entre el 5% y el 95% de resultados positivos. Si no existe una referencia conocida, se puede usar una muestra fuertemente positiva y los resultados se expresarán en términos arbitrarios.

El valor de discriminación no debe confundirse ni con el límite de detección de los ensayos cuantitativos, ni con el valor de corte (“cut-off”). Este último es un valor que se obtiene utilizando diferentes criterios según los intereses del investigador, la mayor parte de las veces analizando la sensibilidad y especificidad del ensayo (Capítulo 3). Para calcular el valor de corte con respecto a los ensayos de referencia, puede usarse un modelo que tiene en cuenta el valor predictivo deseado; variando el nivel de decisión se logra cambiar la sensibilidad, la especificidad y se selecciona el nivel óptimo sobre la base de alcanzar la mayor eficiencia posible. Este procedimiento de cálculo es muy útil en aplicaciones específicas cuando es necesario usar los valores predictivos para el análisis de los resultados, teniendo en cuenta que con un corte correspondiente a un valor predictivo positivo del 100%, podemos afirmar que las muestras positivas por ELISA presentan anticuerpos protectores, si existe concordancia con ensayos funcionales que correlacionen con protección. En el caso del corte correspondiente al valor predictivo negativo del 100%, confirmamos que las muestras negativas realmente lo son. El correspondiente a la mayor coincidencia presentará valores predictivos intermedios.

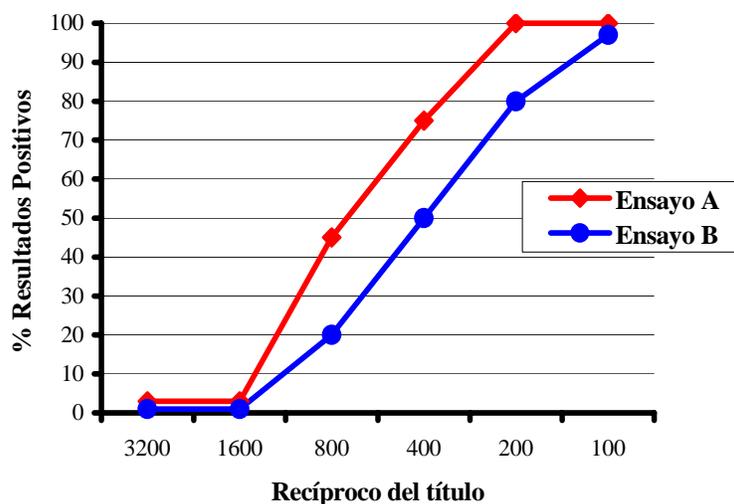


Figura 4.5. Ancho de la zona gris (entre el 5% y el 95%) y el valor de discriminación (50%).

Consideraciones generales sobre las pruebas estadísticas de hipótesis

Las pruebas de hipótesis descritas en la estandarización y validación de las técnicas inmunoenzimáticas, se emplean con el objetivo de determinar la existencia o no de diferencias significativas para un grado de probabilidad determinado, generalmente del 5%. El valor P es la probabilidad de obtener un estadígrafo igual o mayor que el calculado con los datos, suponiendo que en realidad no hay diferencia entre los grupos. En otras palabras, el valor P es la probabilidad de equivocarse al afirmar que existe una diferencia verdadera. Así, si este valor es mayor al 5% ($P > 0,05$) no rechazamos la hipótesis nula y concluimos que los grupos evaluados son estadísticamente similares según los enunciados establecidos en cada caso.

Podemos concluir este Capítulo, recalcando la importancia que para el análisis de la inmunogenicidad de vacunas tiene el contar con herramientas de evaluación apropiadas que permitan conocer la magnitud de la respuesta inmune generada.

Estos recursos son igualmente necesarios para garantizar la reproducibilidad de los resultados en los estudios preclínicos y en las distintas fases de los ensayos clínicos, así como en la determinación de la consistencia de los lotes de producción, aplicados a una población determinada.

Los inmunoensayos cuantitativos son fundamentales para estos estudios; sin embargo, los cualitativos, a pesar de que no brindan una información numérica de los resultados, son útiles sobre todo en aquellos casos en que no se cuenta con materiales de referencia, o cuando no son bien conocidos los niveles protectores de los efectores involucrados en los posibles mecanismos de protección.

No debe subestimarse la importancia de los inmunoensayos, los cuales deben normalizarse y validarse en estadios tempranos del desarrollo de todo candidato vacunal.

Bibliografía

1. Acanda ME, Leiva T, Bolaños G, Quintero R, Sotolongo F, Martínez I, et al. "Adherencia de *Neisseria meningitidis* a células epiteliales", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 1997; 17:149-52.
2. Aggerbeck H, Norgaard-Pedersen B, Heron I. "Simultaneous Quantitation of Diphtheria and Tetanus Antibodies by Double Antigen, Time-Resolved Fluorescence Immunoassay", *Journal of Immunological Methods*, 1996; 190:171-83.
3. Amalia M, Anwar N, Leiva T, Arnet A, Sotolongo F, Ison C. "Resultados preliminares de la evaluación de diferentes concentraciones de la suspensión bacteriana empleada como inóculo en el Ensayo Bactericida de Sangre Total", *VacciMonitor*, 2000; 9(2):14-8.
4. Andersen J, Berthelsen L, Lind I. "Measurement of Antibodies against Meningococcal Capsular Polysaccharide B and C in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay towards an Improved Surveillance of Meningococcal Disease", *Clin Diag Lab Immunol*, 1997; 4:345-51.
5. 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*, Vol. 3, No. 3, London, European Committee for Clinical Laboratory Standards, 1986.
6. 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*, Vol. 3, No. 3, London, European Committee for Clinical Laboratory Standards, 1987.

Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas
mediante técnicas inmunoenzimáticas

7. Bunch DS, Rocke DN, Harrison RO. "Statistical Design of ELISA Protocols", *J Immunol Methods*, 1990; 132:247-54.
8. Cura E, Wendel S. *Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los Bancos de Sangre*, Washington D.C., Organización Panamericana de la Salud, 1994.
9. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. *A WHO Guide to Good Manufacturing Practice (GMP) Requirements. Part 2: Validation. Validation of Analytical Assays*, Geneva, WHO; 1997, pp.65-95.
10. Hong HA, Ke NT, Nhon TN, Think ND, Van der Gun JW, Hendriks JT, et al: "Validation of the Combined Toxin-Binding Inhibition Test for Determination of Neutralizing Antibodies against Tetanus and Diphtheria Toxins in a Vaccine Field Study in Viet Nam", *Bull World Health Organ*, 1996 ;74:275-82.
11. International Organization for Standardization. *ISO 5725-1:1994. International Standard. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 1: General Principles and Definitions*, Geneva, The Organization, 1994.
12. International Organization for Standardization. *ISO 5725-2:1994. International Standard. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 2: Basic Method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method*, Geneva, The Organization, 1994.
13. International Organization for Standardization. *ISO 5725-3:1994. International Standard. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 3: Intermediate Measures of the Precision of a Standard Measurement Method*, Geneva, The Organization, 1994.
14. International Organization for Standardization. *ISO 5725-4:1994. International Standard. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 1: Basic Methods for the Determination of the Trueness of a Standard Measurement Method*, Geneva, The Organization, 1994.
15. Ison CA, Anwar N, Cole MJ, Galassini R, Heyderman RS, Klein NJ, et al. "Assessment of Immune Response to Meningococcal Disease: Comparison of a Whole-Blood Assay and the Serum Bactericidal Assay", *Microb Pathog*, 1999; 27:207-14.
16. Ison CA, Heyderman RS, Klein NJ, Peakman M, Levin M. "Whole Blood Model of Meningococcal Bacteraemia –a Method for Exploring Host-Bacterial Interactions", *Microb Pathog*, 1995; 18:97-107.
17. Karpinski KF, Hayward S, Tryphonas H. "Statistical Considerations in the Quantitation of Serum Immunoglobulin Levels Using the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", *J Immunol Methods*, 1987; 103:189-94.
18. Kroll M.H, Emancipator K.: "A Theoretical Evaluation of Linearity", *Clin Chem*, 1993; 39:405-13.

19. Martínez JC, Ochoa R, Cruces A, Fajardo EM, Alvarez E, Ferriol X, et al. "Validation of an ELISA for the Quantitation of Diphtheria Antitoxin in Human Serum", *Biotechnología Aplicada*, 2000; 17:183-6.
20. Martínez JC, Ochoa R, Estrada E, Riverón L., González M, Ferriol X, et al. "Validación de un ELISA para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas humanas anti polisacárido capsular de *Salmonella typhi*", *VacciMonitor*, 1999; 8(8):7-10.
21. Mayte N, Ochoa R, Martínez JC, Licea T, Ferriol X, García AM, Blanco R, Estrada E. "Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG humana anti polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C", *Biotechnología Aplicada*, 1999; 16:113-15.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods; Proposed Guideline. NCCLS Document EP6-P6*, Villanova, PA, The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1986.
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Tentative Guideline. NCCLS Document EP9*, Villanova, PA, The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993.
24. Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X, Blanco R, et al. "Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas", *VacciMonitor*, 2000; 9(1):17-20.
25. Ochoa R, Martínez JC, Fajardo EM, Álvarez E, Estrada E, García AM, et al. "Validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano", *VacciMonitor*, 2000; 9(4):16-21.
26. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R, et al. "Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas", *VacciMonitor*, 1999; 8(10):9-13.
27. Ochoa R. "A New Format ELISA for the Detection of HBsAg", *Biotechnología Aplicada*, 1998; 15:250-3.
28. Ochoa R. "Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos", Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias Médicas, Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, 2002.
29. 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.
30. Rodríguez L, Balmaseda A, Bravo J, Trujillo J, Martínez L, Ochoa R, et al. "Validación de un ultramicroELISA de detección de anticuerpos contra el

Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas
mediante técnicas inmunoenzimáticas

- antígeno de superficie de la hepatitis B”, *Rev Cubana Med Trop*, 1996; 48(1): 45-9.
31. Serret A, Rosales I. *Validación de métodos analíticos. Segundo Taller Nacional de Validación*, Ciudad de La Habana, Grupo Nacional de Validación, 1997.
 32. Thielmann K. *Principios de metodología en bioquímica clínica*, Ed. Organismos, Instituto Cubano del Libro, 1973.
 33. World Health Organization. “Potency Control of Bacterial Vaccines”, *Manual of Laboratory Methods for Testing of Vaccines Used in the WHO Expanded Programme on Immunization*, Geneva, The World Health Organization, 1997, pp.99-180.

Capítulo 5

Evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas preventivas

El desarrollo de una vacuna se inicia desde el momento en que surge la idea o el concepto y termina con la entrega del producto terminado. El lapso de tiempo entre uno y otro puede abarcar fácilmente diez o más años y su costo asciende usualmente a millones de dólares.

Luego de surgida la idea de producir una vacuna contra determinada enfermedad, se inicia la investigación y el desarrollo de la sustancia activa; es decir, encontrar un inmunógeno que dentro de las fases de desarrollo demuestre ser capaz de producir una respuesta protectora.

Posteriormente se inicia todo el desarrollo clínico, se contemplan los aspectos de regulación y se inicia el proceso de fabricación a escala industrial.

En la fase exploratoria o preclínica, luego de la selección y producción a menor escala de los principios activos, se inician los estudios en animales, para determinar seguridad, toxicidad por dosis única y repetida, tolerancia local, relación dosis/respuesta e inmunogenicidad, entre otros.

Paralelamente a esta etapa preclínica, se van realizando los estudios fisicoquímicos, que incluyen pruebas de identidad del producto, caracterización molecular, estabilidad y consistencia.

Terminado este proceso, que puede durar muchos meses, se inicia la etapa de investigación clínica en seres humanos.

Ensayos clínicos de vacunas

Entendemos por “ensayos clínicos de vacunas” los estudios sistemáticos en seres humanos con el fin de demostrar la seguridad, reactogenicidad, inmunogenicidad y protección de los productos biológicos que reúnen esa condición. Los términos “ensayo clínico” y “estudio clínico” son sinónimos.

Clasificación

Los ensayos clínicos de vacunas preventivas se clasifican generalmente en cuatro fases. No es necesario delimitar con precisión las líneas divisorias,

cada una de estas fases es funcional y los términos no son definidos sobre una estricta base cronológica. De hecho algunas fases durante la estrategia de evaluación clínica pueden superponerse o solaparse (por ejemplo, estudios fase I/II, fase II/III).

La fase I comienza con la administración inicial de un nuevo candidato vacunal a humanos e intenta determinar la tolerabilidad local y sistémica del rango de dosis necesario para continuar los estudios clínicos y determinar la naturaleza de las reacciones adversas que pueden esperarse. Los estudios de seguridad comparativa deben ser aleatorizados, a ciegas y controlados, para garantizar la validez de las observaciones. Se emplea un pequeño número de voluntarios, usualmente entre 10 y 40. Además, una información preliminar de la inmunogenicidad de la vacuna se puede obtener a través de inmunoensayos apropiados.

Los estudios de fase II tienen como objetivo estudiar la inmunogenicidad, esquema de inmunización, reactogenicidad y duración de la protección, relacionados con variables como edad, sexo u otros en un número creciente de participantes voluntarios, habitualmente entre alrededor de 60 a 300, asignados a grupos que permitan la evaluación estadística de los resultados. Estos estudios han sido subdivididos en fase II-a, diseñados para determinar la reactogenicidad, inmunogenicidad y el mejor esquema de inmunización; incluidas las dosis, vía e intervalo entre las dosis, y en fase II-b, ensayos bien controlados, aleatorizados y a ciegas que permiten la evaluación preliminar de la eficacia, en particular cuando es posible llevar a cabo estudios de reto contra determinados microorganismos bajo condiciones controladas. Para estos estudios se requieren lotes elaborados bajo normas de Buenas Prácticas de Producción. Debe haber una definición clara de la formulación y de los adyuvantes utilizados.

Los ensayos clínicos fase III son estudios cuyo objetivo principal es confirmar la eficacia terapéutica del producto en investigación con lotes fabriles. Son diseñados para confirmar las evidencias de seguridad y eficacia acumuladas en la fase II, para la indicación propuesta y la población receptora. Se trata de estudios bien controlados, aleatorizados y a ciegas, en los que participan más de mil personas, generalmente decenas de miles, dependiendo de la incidencia esperada de la enfermedad, con la intención de suministrar la información adecuada para poder obtener el registro para su comercialización. Los participantes son aleatoriamente asignados a un grupo

experimental o de control y seguidos durante un tiempo. Se determina la eficacia de la vacuna evaluando la incidencia de la enfermedad en ambos grupos. Estos ensayos pueden utilizarse para valorar, entre otros, la relación dosis-respuesta, y explorar el uso del producto en extensas poblaciones, estados fisiológicos especiales e interacción con otras vacunas o medicamentos. La detección de los niveles de inmunorrespuesta a la vacunación, generalmente en una submuestra por motivos de costo, permite determinar la relación entre estos niveles y el grado de protección. Cuando se conoce el nivel protector de anticuerpos, un estudio de inmunogenicidad puede ser suficiente para avalar la eficacia clínica, esta estrategia tiene una importancia particular si la incidencia de la enfermedad evaluada es baja, dificultando la ejecución de estudios de campo.

Los voluntarios que participan en estos ensayos son siempre sujetos sanos, a menos que sean vacunas terapéuticas; se tiene en cuenta su interés expreso de participar en el estudio y sólo después de obtener su conformidad a través del consentimiento informado.

Una vez aprobada una vacuna para su comercialización, se hace indispensable la ejecución de programas de vigilancia epidemiológica y farmacológica, que permitan evaluar tanto su eficacia como su seguridad, ya que las diferencias individuales pueden provocar respuestas inmunes inadecuadas y reacciones adversas no detectadas durante los ensayos clínicos, aún cuando hayan sido desarrollados sobre un número significativo de individuos. Se realizan entonces los estudios de fase IV, estudios de poslicenciamiento o poscomercialización, que se basan en el monitoreo sistemático del comportamiento de la vacuna donde ha sido aplicada, incluida la evaluación de la respuesta inmune inducida por la misma en estas condiciones.

La clasificación en las fases de desarrollo descritas no proporciona realmente la mejor base para el análisis, debido a que un tipo de ensayo puede ocurrir en varias fases. El concepto de fases está relacionado más bien con una descripción que con un conjunto de requerimientos. Las fases temporales no implican un orden fijo de estudios, ya que en algunos la secuencia típica no será apropiada o necesaria. En la actualidad se prefiere hablar de tipos de estudios según los objetivos en lugar de fases, así tendremos estudios de seguridad, reactogenicidad, inmunogenicidad y eficacia (Figura 5.1).

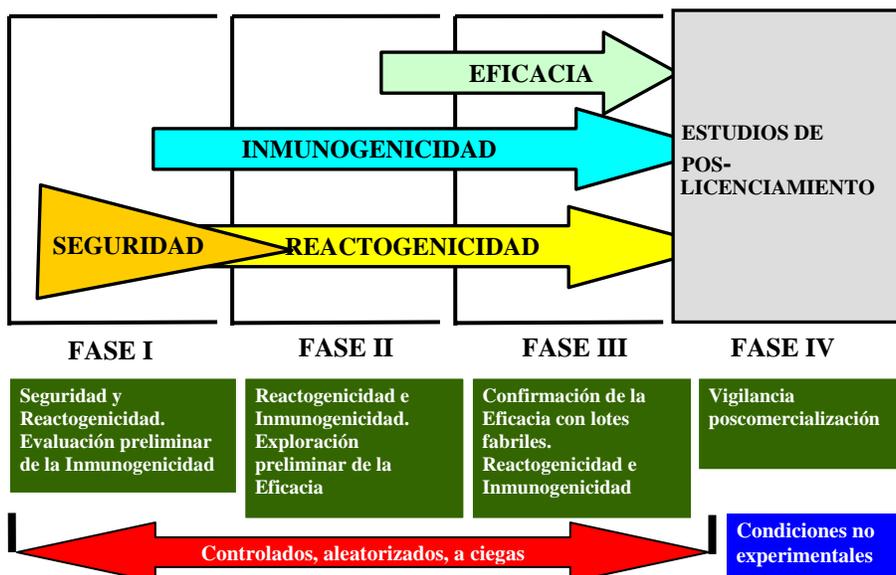


Figura 5.1. Tipos de estudios y fases de los ensayos clínicos.

Características generales de los estudios de inmunogenicidad

La inmunogenicidad se reconoce como la capacidad de una vacuna para inducir inmunidad, ya sea mediada por anticuerpos (inmunidad humoral) o por células (inmunidad celular).

Deberán tenerse en cuenta las consideraciones siguientes:

1. Los estudios de inmunogenicidad de vacunas preventivas deben ser aleatorizados, controlados y generalmente en voluntarios sanos.
2. Se realizarán evaluaciones para conocer el esquema de inmunización óptimo. Se incluye la realización de ensayos dosis/respuesta, haciendo énfasis en la evaluación del intervalo óptimo entre las primeras inmunizaciones y las dosis de refuerzo, cuando proceda.
3. La vacuna en estudio deberá ser la misma que la que será comercializada y evaluada frente a las existentes.
4. La inmunogenicidad deberá ser estudiada en grupos cuyas edades correspondan con las indicaciones del producto. Es necesario tener en cuenta las diferencias inmunológicas acordes con la edad.

5. En general deben excluirse los sujetos alérgicos a los componentes de la vacuna, las embarazadas, sujetos con procesos febriles o infecciosos y aquellos bajo tratamiento inmunomodulador.
6. Al inicio del estudio (antes de la vacunación) deberán tomarse las muestras pertinentes para la evaluación de los efectores de la respuesta inmune involucrados, como es el caso de obtención de suero para titulación de anticuerpos.
7. Se realizará una nueva toma de muestra entre 15 y 30 días después de la vacunación.
8. Deberá comprobarse una significativa seroconversión, considerando las diferencias entre los títulos inicial y final. Se determinará el porcentaje de individuos con seroconversión, así como la media geométrica de los títulos y los intervalos de confianza al 95%. Es importante establecer en la hipótesis del protocolo del estudio el nivel de la diferencia que se debe evaluar, para calcular el tamaño de la muestra. Es conveniente, además, establecer la relación entre el nivel de la respuesta inmune y la protección conferida por la vacuna, o sea, el correlato de protección o protección correlativa. Es preferible emplear la seroprotección para el análisis de los resultados.
9. En el caso de vacunas conocidas o cuando se efectúen cambios en el proceso de producción, al menos un lote deberá ser evaluado clínicamente.
10. Para el caso de vacunas combinadas, se recomienda que los estudios se diseñen de manera tal que la inmunogenicidad en la combinación pueda compararse con la inducida por cada uno de los componentes por separado.

Tipos de estudio para evaluar la inmunogenicidad

1. Ensayo de superioridad, cuyo objetivo primario es demostrar que la inmunogenicidad de la vacuna en estudio (experimental) es superior a la vacuna control o placebo. Siempre es preferible el uso de una vacuna en lugar de un placebo inerte, de esta forma todos los individuos alistados en un ensayo clínico reciben algún beneficio de su participación. Un placebo inerte sólo debe usarse cuando esté justificado éticamente, como pudiera ser, utilizar para este fin el

diluyente de una vacuna oral líquida. El ensayo de superioridad es empleado cuando no se dispone de una vacuna de similar composición que pueda usarse como comparador activo.

2. Ensayo de equivalencia, es aquel cuyo objetivo primario es demostrar que la respuesta inmune inducida por la vacuna en estudio es similar a una vacuna control, lo que se demuestra estadísticamente demostrando que la respuesta inmune detectada se encuentra comprendida entre márgenes de equivalencia, superiores e inferiores, clínicamente aceptables.
3. El diseño de no-inferioridad es el recomendado para evaluar la inmunogenicidad cuando se cuenta con comparadores activos. Es un ensayo de equivalencia unilateral; su objetivo primario radica en demostrar que la respuesta inmune de la nueva vacuna no es inferior, dentro del margen establecido, a una vacuna comercial empleada como comparador activo. El investigador deberá definir con claridad dicha diferencia o límite de no-inferioridad, para lo cual tiene que precisar los porcentajes de seroconversión o seroprotección estimados para ambas vacunas. Este estudio puede incluir un placebo inerte u otra vacuna utilizada como comparador pasivo; de esta forma, al establecerse la superioridad de la vacuna en estudio con respecto a los anteriores, podrá validarse el ensayo y evaluar con más seguridad el grado de similitud con el comparador activo.

Reporte de los resultados de los inmunoensayos enzimáticos

El reporte de los resultados de un ELISA puede darse en forma cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa, aunque siempre es preferible diseñar ensayos cuantitativos para evaluar la inmunogenicidad de vacunas en ensayos clínicos y para estudios seroepidemiológicos, aun cuando la interpretación final en algunos casos se realice en términos cualitativos al determinar la seroconversión inducida por una vacuna.

La concentración de los antígenos puede ser fácilmente determinada a partir de curvas dosis/respuesta. Sin embargo, las curvas, tanto para antígenos como para anticuerpos, son sigmoidales, y su parte más sensible es la pequeña zona de mayor pendiente. Además de esta limitación, las curvas de anticuerpos son complicadas, porque:

1. Su rango es generalmente mucho mayor que las curvas para antígeno.
2. Las curvas para diferentes antisueros son raramente paralelas, debido a la heterogeneidad en la concentración, afinidad y la representación de diferentes isotipos.

Métodos para expresar los resultados de los inmunoensayos enzimáticos usados para detectar anticuerpos

1. Titulación. La muestra se diluye de forma seriada hasta el límite en el cual la reacción enzimática no pueda ser detectada. La intersección de la curva con el valor de corte establecido da el título. Este método es laborioso, costoso y menos exacto que otros procedimientos.
2. Dosis efectiva. La principal diferencia con el método anterior está dada en que la estimación se hace en la parte lineal de la curva sigmoideal. Es un método más exacto pero muy trabajoso.
3. Valor de lectura. Los resultados habitualmente son expresados en valores de absorbancia cuando se usan substratos cromogénicos, o en unidades arbitrarias de fluorescencia cuando se emplean substratos fluorogénicos. Sin embargo, este proceder no es muy confiable, los valores de absorbancia o fluorescencia no son proporcionales a los títulos y la imprecisión interensayo es elevada.
4. Respecto a una muestra de referencia. Se han empleado diferentes procedimientos para normalizar los resultados, entre ellos las razones entre las muestras y la referencia negativa o positiva, y el calculado a partir de las áreas bajo la curva de la muestra estudiada y la curva de referencia. Los primeros son relativamente sencillos, pero los resultados no son linealmente proporcionales a los títulos. El último método requiere diluciones seriadas de la muestra, lo que lo hace engorroso y costoso.
5. Múltiplo de la actividad normal. Se define como el número de veces que la muestra debe diluirse con respecto a la referencia para obtener su misma señal. Se asume que las curvas son paralelas y la pendiente por tanto puede ser calculada con un análisis de regresión. Este procedimiento es relativamente lineal y su detectabilidad es elevada. Sin embargo, es muy dependiente del material biológico de referencia y el rango útil de la curva es pequeño.

6. Percentil estimado con respecto a muestras de referencia. Se obtiene una distribución de frecuencias acumulativas de un panel de más de 100 muestras normales, con las que se comparan las muestras estudiadas. Este método tiene como limitante que sus resultados no son proporcionales a los títulos y el panel de referencia tiene que ser cuidadosamente seleccionado.
7. Expresión de las curvas dosis/respuesta en unidades estándares. La curva obtenida mediante el ploteo de los títulos de varias muestras, que abarquen desde valores negativos hasta fuertemente positivos, contra sus valores de lectura, permite su transformación en unidades cuantitativas. Deben prepararse estándares a partir de mezclas de diferentes muestras (sueros u otro material biológico), garantizando así un comportamiento paralelo; si una sola muestra es empleada, lo que no es recomendado, hay que verificar rigurosamente su paralelismo con otros antisueros. El uso de estándares para la construcción de las curvas y muestras controles para la calibración interna, garantizan la consistencia analítica. Este método que recomendamos tiene las ventajas de que se requiere generalmente una sola dilución, que los resultados son proporcionales a los títulos y los resultados se dan en una escala continua; se expresan en unidades arbitrarias (U/mL), en unidades de masa, usualmente $\mu\text{g/mL}$, o unidades internacionales (UI/mL), previa calibración contra estándares de referencia.

Las *curvas de calibración* en los ELISAs son difíciles de describir con la ley de acción de masas, porque no es predecible la avidéz ni la cantidad real de los inmunorreactantes. Las curvas no son lineales y, para obtener la función precisa, una o ambas variables requieren ser transformadas mediante diferentes modelos, entre los que señalamos:

- Regresión parabólica
- Regresión polinomial
- Regresión lineal ponderada después de transformación logit-log
- Regresión lineal no ponderada después de transformación logit-log
- Función logit-log de cuatro parámetros

La función logit-log de cuatro parámetros es muy usada para representar los datos de curvas de calibración de al menos cinco puntos, que se

construyen habitualmente usando dos técnicas de ajuste: estimación no ponderada de mínimos cuadrados y estimación robusta ponderada de mínimos cuadrados, usando diferentes algoritmos; entre los más empleados están el de linealización de Taylor y el de Marquardt. La no ponderada estima los parámetros sin tener en cuenta las posibles diferencias en la variabilidad de las mediciones de punto a punto y puede afectarse por observaciones anómalas. La ponderada ajusta cada observación de forma individual y analiza los valores observados y esperados para cada punto, de esta forma influyen menos los valores aberrantes.

Criterios de evaluación de anticuerpos inducidos por vacunas

Se usan generalmente dos criterios: valoración del incremento de los títulos de anticuerpos inducidos por un candidato vacunal y estimación del grado de protección alcanzado, siempre y cuando puedan establecerse apropiados correlatos de protección.

Cuando no se conoce con exactitud cuál es el nivel mínimo de protección, se estudia la respuesta pre y posvacunación. Esto puede hacerse simplemente aplicando las pertinentes pruebas estadísticas según el tipo de variable empleada, aunque habitualmente se analiza la seroconversión, definida como un aumento significativo de los títulos. Con frecuencia se ha usado un incremento de cuatro, pero este valor depende realmente de la precisión del método. Las técnicas semicuantitativas deben mantener dicho criterio; sin embargo, no deben extrapolarse a otras cuantitativas, tales como el ELISA, con las virtudes señaladas, para las cuales duplicar los valores de actividad o concentración pudiera ser suficiente.

Para los estudios seroepidemiológicos es importante establecer correlatos de protección, como se puede obtener en aquellos ensayos que cuenten con modelos animales adecuados, ya que generalmente se trabaja con muestras no pareadas y se requiere conocer con exactitud el nivel mínimo de anticuerpos protectores. En ocasiones puede establecerse un gradiente de concentración que permite clasificar a los individuos por grado de protección.

En los ensayos clínicos de vacunas con valores establecidos para la protección, se pueden analizar los resultados sin la necesidad incluso de parear las muestras; de esta forma se calculan las medias geométricas e intervalos de confianza al 95% de cada distribución, previa normalización logarítmica y se determina el porcentaje de individuos protegidos o no. Se

estima, entonces, si existen o no diferencias entre la respuesta inmune inducida por la vacuna y la respuesta basal existente antes de iniciar el esquema de inmunización. Cuando no se hayan establecido claramente dichos valores, deben evaluarse los resultados con un enfoque cualitativo, como ya señalamos. En todo caso, además de calcular el porcentaje de individuos que seroconvierten o están protegidos, es útil la estimación de los intervalos de confianza de proporciones.

La estimación de los intervalos de confianza es extremadamente útil, y aunque las pruebas de hipótesis mantienen su vigencia, en la investigación biomédica es más importante conocer la magnitud de la diferencia y no una simple indicación de si esta es o no estadísticamente significativa. Debe tenerse en cuenta que pequeñas diferencias sin interés real pueden ser significativas, mientras que efectos clínicamente importantes pueden no serlo. Por otra parte, la determinación de un intervalo de confianza y la realización de una prueba bilateral de hipótesis son dos procedimientos estadísticos estrechamente relacionados. Cuando se determina el intervalo de confianza es posible deducir el resultado de la prueba de hipótesis al nivel correspondiente de significación estadística.

Puedo concluir que el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas es imprescindible si se quiere contar con instrumentos adecuados para evaluar los anticuerpos inducidos por inmunógenos que garanticen además la reproducibilidad de los resultados. Para ello se requiere de una adecuada estandarización y validación. Si se logra un ensayo cuantitativo, con correlatos adecuados de protección, el ELISA por sus ventajas, resulta una herramienta insustituible para evaluar la inmunogenicidad de vacunas en las distintas fases de los ensayos clínicos.

Bibliografía

1. Aggerbeck H, Norgaard-Pedersen B, Heron I. "Simultaneous Quantitation of Diphtheria and Tetanus Antibodies by Double Antigen, Time-Resolved Fluorescence Immunoassay", *Journal of Immunological Methods*, 1996; 190:171-83.
2. Andre FE, Foulkes MA. "A Phased Approach to Clinical Testing: Criteria for Progressing from Phase I to Phase II to Phase III Studies", *Dev Biol Stand*, 1998; 95:57-60.

3. Ann NQ, Hong HA, Nhon TN, Think ND, Van NT, Hendriks J. "Tetanus Antibodies Measured by the Toxin Binding Inhibition Test (ToBI) in Mothers and Children in the Neonatal Tetanus Program in Vietnam", *Dev Biol Stand*, 1999; 101:247-53.
4. Blackwelder WC. "Showing a Treatment is Good Because it is not Bad: When does Noninferiority Imply Effectiveness", *Controlled Clinical Trials*, 2002; 23(1):52-4.
5. 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*, Vol. 3, No. 3, London, European Committee for Clinical Laboratory Standards, 1986.
6. 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*, Vol. 3, No. 3. London, European Committee for Clinical Laboratory Standards, 1987.
7. Bunch DS, Rocke DN, Harrison RO. "Statistical Design of ELISA Protocols", *J Immunol Methods*, 1990; 132:247-54.
8. Chen RT, Hardy IRB, Rhodes PH, Tyshchenko DK, Moiseeva AV, Marievsky VF. Ukraine, 1992: "First Assessment of Diphtheria Vaccine Effectiveness During the Recent Resurgence of Diphtheria in the Former Soviet Union", *J Infect Dis*, 2000; 181 Suppl. 1:178-83.
9. De Melker HE, van der Hof S, Berbers GA, Nagelberke NJ, Rumke HC, Lonyvan Spaendonck M.A.: "A Population-Based Study on Tetanus Antitoxin Levels in the Netherlands", *Vaccine*, 1999; 18:100-8.
10. Dokmetjian J, Della Valle C, Lavigne V, De Lujan CM, Manghi MA. "A Possible Explanation for the Discrepancy Between ELISA and Neutralizing Antibodies to Tetanus Toxin", *Vaccine*, 2000; 18:2698-703.
11. Ellis RW. "Immunological Correlates for Efficacy of Combination Vaccines", en: Ellis RW, editor: *Combination Vaccines: Development, Clinical Research, and Approval*, Totowa (NJ), Humana Press Inc, 1999, pp.107-31.
12. Fernández J.A., Malberty J.A., Sotolongo F., Bacallao J., Camaraza M.A., Nerey MC, et al. "Cinética de la respuesta de anticuerpos bactericidas y de la IgG específica en individuos vacunados con VA-MENGOC-BC[®]", *Rev. Cubana Hematol Immunol Hemoter*, 1997; 13(1):38-45
13. Galazka AM, Robertson SE. "Immunization Against Diphtheria with Special Emphasis on Immunization of Adults", *Vaccine*, 1996; 14:845-57.

14. Galazka AM. *The Immunological Basis for Immunization Series. Module 3. Tetanus*. Geneva, World Health Organization, 1996.
15. Galazka AM. *The Immunological Basis for Immunization Series. Module 2. Diphtheria*. Geneva, World Health Organization, 1996.
16. Galen JE, Gómez G, Losonsky GA, Halpern JL, Lauderbaugh CS, Kaintuck S, et al. "A Murine Model of Intranasal Immunization to Assess the Immunogenicity of Attenuated *Salmonella* Typhi Live Vector Vaccines in Stimulating Serum Antibody Responses to Expressed Foreign Antigens", *Vaccine*, 1997; 15:700-8.
17. Gardner MJ, Altman DG. "Intervalos de confianza y no valores p: estimación en vez de pruebas de hipótesis", *Bol of Sanit Panam*, 1993; 114:536-49.
18. Gheesling LL, Carlone GM, Pais LB, Holder PF, Maslanka SE, Plykaytis BD, et al. "Multicenter Comparison of *Neisseria Meningitidis* Serogroup C Anti-Capsular Polysaccharide Antibody Levels Measured by a Standardized Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", *J Clin Microbiol*, 1994; 32:1475-82.
19. Granstrom M. "Validation of Laboratory Studies", en: Merieux Foundation, editor: *Proceedings of the Advanced Vaccinology Course*; 2000, May 22-June 3, Annecy, France, The Merieux Foundation, 2000, p. S II.
20. Harlow E, Lane D, editors. "Immunoassays", en: *Antibodies. A laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1998, pp.553-612.
21. Karpinski KF, Hayward S, Tryphonas H. "Statistical Considerations in the Quantitation of Serum Immunoglobulin Levels Using the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", *J Immunol Methods*, 1987; 103:189-94.
22. Khetsuriani N, Music S, Deforest A, Sutter RW. "Evaluation of a Single Dose of Diphtheria Toxoid Among Adult in the Republic of Georgia, 1995: Immunogenicity and Adverse Reactions", *J Infect Dis*, 2000; 181 Suppl. 1:208-12.
23. 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; 65:2088-93.
24. Kroll MH, Emancipator K. "A Theoretical Evaluation of Linearity", *Clin Chem*, 1993; 39:405-13.
25. Lwanga SK, Lemeshow S. *Determinación del tamaño de las muestras en los estudios sanitarios. Manual práctico*, Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1991.

Dr. Rolando Ochoa Azze

26. Maslanka SE, Gheesling LL, Libutti DE, Donaldson KB, Harakeh HS, Dykes JK. et al. "Standardization and a Multilaboratory Comparison of *Neisseria Meningitidis* Serogroup A and C Serum Bactericidal Assays. The Multilaboratory Study Group", *Clin Diagn Lab Immunol*, 1997; 4:156-67.
27. Maslanka SE, Tappero JW, Plikaytis BD, Brumberg RS, Dykes JK, Gheesling LL, et al. "Age-Dependent *Neisseria Meningitidis* Serogroup C Class-Specific Antibody Concentrations and Bactericidal Titers in Sera from Young Children from Montana Immunized with a Licensed Polysaccharide Vaccine", *Infect Immun*, 1998; 66:2453-9.
28. Milagres LG, Lemos APS, Meles CEA, Silva EL, Ferrerira LH, Souza JA, et al. "Antibody Response after Immunization of Brazilian Children with Serogroup C Meningococcal Polysaccharide Noncovalently Complexed with Outer Membrane Proteins", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1995; 28:981-9.
29. Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X, Blanco R, et al. "Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas", *VacciMonitor*, 2000; 9(1):17-20.
30. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R, et al. "Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas", *VacciMonitor*, 2000; 9(3):13-8.
31. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R, et al. "Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas", *VacciMonitor*, 1999; 8(10):9-13.
32. Ochoa R, Martínez JC, Ginebra M, Ferriol X, Rodríguez V, Sotolongo F. "Immunogenicity of a New *Salmonella* Typhi Vi Polysaccharide Vaccine –vax-TyVi– in Cuban School Children and Teenagers", *Vaccine*, 2003; 21:2758-60.
33. Ochoa R. "Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos", Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias Médicas, Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, 2002.
34. Oellerich M. "Enzyme Immunoassay: A Review", *J Clin Chem Clin Biochem*, 1984; 22:895-904.
35. Panchanatan V, Kumar S, Yeap W, et al. "Comparison of Safety and Immunogenicity of a Vi Polysaccharide Typhoid Vaccine with a Whole-Cell-Killed Vaccine in Malaysian Air Forces Recruits", *Bull World Health Organ*, 2001; 79(9):811-17.

36. Pérez A, Menéndez J, Baró M. “Algunas consideraciones sobre la realización de ensayos clínicos de vacunas en humanos”, *VacciMonitor*, 1999; 8(4):9-12.
37. Peterman JH. “Immunochemical Considerations in the Analysis of Data from Noncompetitive Solid-Phase Immunoassays”, en: Butler J.E., editor: *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassays*, Florida, CRR Press Inc.; 1991, pp.47-67.
38. Plikaytis BD, Carlone GM, Turner SH, Gheesling LL, Holder PF. *Program ELISA User's Manual*, Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention, 1993.
39. 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.
40. Rosenqvist E, Hoiby EA, Bjune G, Aase A, Halstensen A, Lehmann AK, et al. “Effect of Aluminium Hydroxide and Meningococcal Serogroup C Capsular Polysaccharide on the Immunogenicity and Reactogenicity of a Group B *Neisseria Meningitidis* outer Membrane Vesicle Vaccine”, *Dev Biol Stand*, 1998; 92:323-33.
41. Skoura L, Efstratiou A, Tsakris A, Pournaras S, George RC, Douboyas J. “Study on the Use of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Determining Human Antibodies to Diphtheria Toxin as Compared with a Reference Toxin Neutralization Assay”, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1999; 22:181-6.
42. SmithKline Beecham Biologicals: *Seminario de Buenas Prácticas Clínicas*, Instituto Finlay, Ciudad de La Habana, Cuba, Marzo 13-16, 2000.
43. Souliou E, Kyriazopoulou V, Diza E, Hatzistylianou M, Frantzidou F. “Serological Survey on the Immunity to Diphtheria of the Northern Greek Population”, *Eur J Epidemiol*, 1997; 13:535-9.
44. Sutter RW, Hardy IR, Kozlova IA, Tchoudnaia LM, Gluskevich TG, Marievsky V, et al. “Immunogenicity of Tetanus-Diphtheria Toxoids (Td) among Ukrainian Adults: Implications for Diphtheria Control in the Newly Independent States of the Former Soviet Union”, *J Infect Dis*, 2000; 181 Suppl 1:197-202.
45. Takahashi M, Komiya T, Fukuda T, Nagaoka Y, Ishii R, Goshima F, et al. “A Comparison of Young and Aged Populations for the Diphtheria and Tetanus Antitoxin Titers in Japan”, *Jpn J Med Sci Biol*, 1997; 50:87-95.
46. Tijssen P. “Processing of Data and Reporting of Results of Enzyme Immunoassays”, en: Burdon R.H., van Knippenberg P.H., editors: *Laboratory*

Dr. Rolando Ochoa Azze

- Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, London, Elsevier, 1993, pp.385-421.
47. Uranga R, Mirabal M. "Elementos esenciales a considerar en los ensayos de no inferioridad". *VacciMonitor*, 2006; 15(3):21-4.
 48. Wiens BL. "Choosing an Equivalence Limit for Noninferiority or Equivalence Studies", *Controlled Clinical Trials*, 2002; 23(1):2-14.
 49. World Health Organization: *Guidelines on Clinical Evaluation of Vaccines. Regulatory Expectations*, Geneva, The World Health Organization, 2002.
 50. World Health Organization: *Operational Guidelines for Ethic Committees that Review Biomedical Research*, Geneva, The World Health Organization, 2000.
 51. World Health Organization: "Potency Control of Bacterial Vaccines", *Manual of Laboratory Methods for Testing of Vaccines Used in the WHO Expanded Programme on Immunization*, Geneva, The World Health Organization, 1997, pp.99-180.
 52. World Medical Association: "Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", *Bulletin of the World Health Organization* 2001; 79:373-4.
 53. Yang HH, Wu CG, Xie GZ, et al. "Efficacy Trial of Vi Polysaccharide Vaccine against Typhoid Fever in South Western China", *Bulletin of the World Health Organization*, 2001; 79(7):625-31.