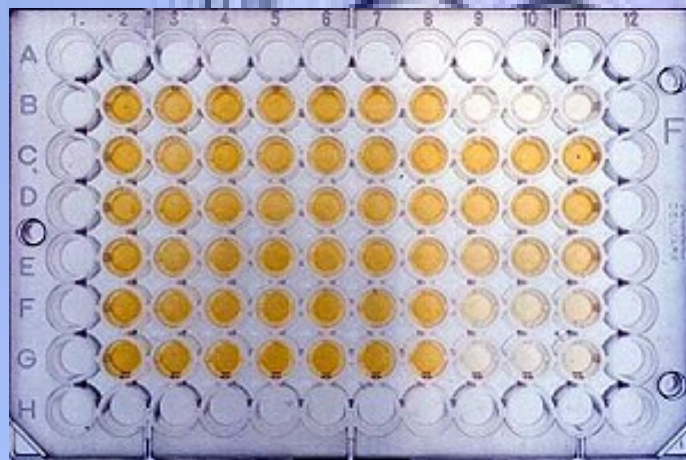


TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS PARA ENSAYOS CLÍNICOS DE VACUNAS Y ESTUDIOS INMUNOEPIDEMIOLÓGICOS



Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze

SERIE
MONOGRAFICA

**TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS
PARA ENSAYOS CLÍNICOS DE VACUNAS
Y ESTUDIOS INMUNOEPIDEMIOLÓGICOS**

Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze

 **FINLAY**
EDICIONES
La Habana, 2012

Edición al cuidado de: Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze
Redacción y corrección: Lic. Virginia Betancourt López

Primera edición, 2012

Disponible en: <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>

© Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze

© Sobre la presente edición:

Finlay Ediciones, 2012

ISBN: 978-959-7076-47-6

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

Agradecimientos

A mis antiguos colegas del Departamento de Inmunología del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas “Victoria de Girón” y del Centro de Inmunoensayo, que me adentraron en el fascinante mundo de las técnicas inmunoenzimáticas. A mis compañeros del Instituto Finlay, en particular del Laboratorio de Inmunoquímica de la Dirección Científico Técnica Aplicada, así como de la Gerencia Médica, que facilitaron mi especialización en el campo de la Vacunología y la Inmunoepidemiología.

Contenido

Prólogo

Sección I. Estandarización y validación de técnicas inmunoenzimáticas / 1

Capítulo 1. Inmunoensayos enzimáticos. Generalidades / 2

Capítulo 2. Estandarización de técnicas inmunoenzimáticas / 10

Capítulo 3. Validación de inmunoensayos cuantitativos y cualitativos / 18

Sección II. Ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos / 31

Capítulo 4. Vacunas. Desarrollo actual y tendencias / 32

Capítulo 5. Evaluación de la inmunogenicidad en el desarrollo clínico de vacunas preventivas / 37

Capítulo 6. Importancia de la inmunoepidemiología en la prevención de enfermedades infecciosas / 46

Epílogo / 55

Glosario / 56

Diapositivas de la Sección I

Diapositivas de la Sección II

Curriculum del autor

Prólogo

Los anticuerpos inducidos por vacunas o presentes en la población en estudios inmunoepidemiológicos, pueden ser medidos por técnicas *in vitro* no funcionales. Entre estos ensayos, el ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay) resulta la técnica de elección para determinar el grado de protección o la seroconversión inducida por una vacuna; también para evaluar la inmunidad poblacional, lo que está dado por su sensibilidad y detectabilidad, su elevada precisión y exactitud, y que con ella pueden procesarse lo mismo un número pequeño que grande de muestras.

Es necesario que los profesionales sepan seleccionar el ELISA apropiado, desarrollarlos, sino están disponibles, e interpretar los resultados. Este curso introduce a los estudiantes en los principales aspectos relacionados con la estandarización y validación de técnicas inmunoenzimáticas, aspectos poco abordados en la literatura, y su aplicación en los ensayos clínicos de vacunas preventivas y estudios inmunoepidemiológicos. La metodología propuesta también es útil en otras investigaciones, básicas o aplicadas, en los que se empleen los inmunoensayos como herramientas analíticas.

Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze

Sección I

Estandarización y validación de técnicas inmunoenzimáticas

Capítulo 1

Immunoensayos enzimáticos. Generalidades

Introducción

Los anticuerpos inducidos por vacunas o presentes en la población en estudios inmunoepidemiológicos, 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. Estos estudios no se recomiendan en humanos por motivos éticos.

La interacción entre los anticuerpos y los antígenos puede ser evaluada por diferentes ensayos *in vitro*. Los funcionales o biológicos, aunque menos engorrosos que los *in vivo*, resultan laboriosos, pero tienen la virtud de correlacionarse con protección; entre estos tenemos el ensayo bactericida en suero y el de actividad opsonofagocítica. 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* cuando estén disponibles, o evaluar su respuesta en estudios clínicos de eficacia vacunal o seroepidemiológicos.

Entre los ensayos *in vitro* no funcionales para la detección de anticuerpos, el ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay) resulta la técnica de elección; su sensibilidad y detectabilidad son semejantes al radioinmunoanálisis, se caracteriza por su precisión y exactitud, y con ella puede procesarse lo mismo un número pequeño que grande de muestras, sin los riesgos que implica el empleo de material radioactivo.

Técnicas inmunoenzimáticas

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 [marcadores](#) para detectar dicha reacción. Se han usado isótopos radioactivos, compuestos fluorescentes y quimioluminiscentes, marcadores electroactivos, lantánidos, radicales libres estables, partículas de látex, liposomas, colorantes, coloides, bacteriófagos y enzimas, entre otros.

Los ensayos que usan como marcador enzimas (técnicas inmunoenzimáticas, immunoensayos enzimáticos o ensayos inmunoenzimáticos) 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.

Las técnicas inmunoenzimáticas constituyen el desarrollo ulterior del radioinmunoanálisis; en lugar de los peligrosos radioisótopos de corta vida media, se emplean enzimas como sustancias marcadoras. 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 sustratos

La popularidad de las enzimas como elemento marcador se debe a su enorme poder catalítico, su alta especificidad, el amplio espectro de sustratos 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.

Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos

- 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 sustratos 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: 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 conjuga fácilmente, tiene 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, con 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 o en estudios seroepidemiológicos, 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 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 estos ensayos: 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 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 epítopos del antígeno, y el producto de una de las enzimas seleccionadas es el substrato 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 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 epítopos; de esta forma se requiere lavar tan sólo en el paso previo al substrato.

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. Esta última variante no es estrictamente competitiva, con ella 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 reaccione con el anticuerpo libre, la reacción puede desplazarse hacia el inmunorreactante de captura, sobre todo cuando es simultánea. Estos ensayos, en especial el de [inhibición de antígeno](#), son útiles para la evaluación de la respuesta inmune humoral, al favorecer la interacción antígeno-anticuerpo que se realiza en la fase líquida, correlacionando habitualmente bien con los ensayos *in vivo*; no obstante, son más laboriosos, sobre todo cuando se requiere procesar un gran número de muestras.

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](#), en el cual los antígenos capturan a los anticuerpos y la reacción se evidencia por el conjugado anti-inmunoglobulina-enzima, o proteína A-enzima. La cantidad de enzima enlazada indica la cantidad de anticuerpos en el suero y puede ser medida por la degradación de su sustrato. No obstante, debe tenerse en cuenta que su correlación con los ensayos *in vivo* se afecta cuando la concentración de anticuerpos es baja, ya que el ELISA indirecto tiende a sobrestimar los sueros de bajos títulos, probablemente esto se deba a la presencia de inmunoglobulinas inespecíficas o anticuerpos de baja afinidad. 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 evaluarse preferentemente con ensayos de [captura IgM](#). Los ensayos indirectos presentan una alta detectabilidad que depende de la densidad de epítomos de relevancia diagnóstica presentes en la fase sólida.

El ELISA tipo [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) u otros procedimientos.

Los ensayos [sándwich doble antígeno](#), 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 capturan los anticuerpos, 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 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.

Los ensayos de captura IgM 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. Avrameas S. "Indirect Immunoenzyme Techniques for the Intracellular Detection of Antigens". *Immunochemistry* 1969;6:825-31.
2. 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.
3. Harlow E, Lane D, editors. "Immunoassays". En: *Antibodies. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998. p.553-612.

4. Johansson 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.
5. 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.
6. Ochoa R. Métodos para la evaluación de anticuerpos inducidos por vacunas. Capítulo 2. En: *Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas*. Ciudad de la Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.12-30.
7. Ochoa R. Principales técnicas de laboratorio para explorar la inmunidad poblacional. Capítulo 5. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.39-48.
8. Oellerich M. "Enzyme Immunoassay: A Review". *J Clin Chem Clin Biochem* 1984;22:895-904.
9. 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.
10. Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF. "Homogeneous Enzyme Immunoassay. A New Immunochemical Technique". *Biochem Biophys Res Commun* 1972;47:846-51.
11. 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 p.9-20.
12. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Nuffield Laboratories of Comparative Medicine. London: Dynatech Europe; 1979.
13. World Health Organization. Clinical evaluation of vaccines. Part B. En: *Annex 1. Guidelines on Clinical Evaluation of Vaccines. Regulatory Expectations*. Geneva: The World Health Organization; 2004. p.55-92.

Capítulo 2

Estandarización de técnicas inmunoenzimáticas

Selección del inmunoensayo

Ante todo debemos precisar qué principio usar para evaluar la inmunogenicidad de una vacuna o candidato vacunal que induzca la producción de anticuerpos, o la detección de estos marcadores en estudios seroepidemiológicos. Podemos seleccionar el clásico ensayo indirecto o los nuevos ensayos de doble antígeno, 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 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 antiseros anti-IgG cadena γ (Factor Absorbente), finalmente el conjugado anti-IgM-enzima detecta esta inmunoglobulina fijada al antígeno de captura.

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: antesubclase-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.

Pasos para la optimización de un inmunoensayo

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) $\geq 0,98$ e incluir el valor mínimo de protección si es conocido. En el ejemplo, las diluciones seleccionadas corresponden a la línea con marcadores cuadrados y en rojo. 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.

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 \pm dos desviaciones estándar (DE), aunque algunos investigadores emplean tres. Hay que tener en cuenta que, atendiendo a la distribución Gaussiana, con dos DE se incluye el 95,5% de las réplicas, y con tres, el 99,7%.

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 pesquisaje requieren la máxima sensibilidad y los confirmatorios, una elevada especificidad.

Para establecer 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 el gráfico de [distribución de frecuencias](#) que presentamos como ejemplo, 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 reactiva o positiva.

Evaluación del recubrimiento o sensibilización de la fase sólida

A) 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 ulteriores 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/cm² en plásticos normales; cuando se usan superficies de alta captación puede incrementarse alrededor de 400 ng/cm². 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 cualidad 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.

En los antígenos de pobre adsorción deben emplearse soportes que faciliten la unión covalente; sin embargo, pueden usarse también plásticos convencionales, y la inmovilización se logra a través de moléculas puentes, como son: 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.

B) 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 inmunorreagentes en la fase líquida. Aunque pueda parecer obvio, debe garantizarse la máxima purificación del material biológico para una óptima inmovilización.
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°C son equivalentes a 16-20 horas a 2-8°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°C, preferentemente con una humedad relativa menor del 50%.

5. Amortiguadores. La adsorción es más fuerte cerca del punto isoelectrico 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.

C) 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 gráfico de [titulación del recubrimiento](#) que les mostramos, la concentración de elección sería sobre los 4 µg/mL.

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 sustratos 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 sustratos colorimétricos para el ELISA y de depósito en el caso de ensayos sobre membrana de nitrocelulosa.

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 siguiente capítulo, 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.

Bibliografía

1. Esser P. “Blocking Agent and Detergent in ELISA”. *Nunc Bulletin* 199;6(9):1-4.
2. Esser P. “Principles in Adsorption to Polystyrene”. *Nunc Bulletin* 1988;11(6):1-5.
3. Harlow E, Lane D, editors. “Immunoassays”. En: *Antibodies. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998. p.553-612.
4. Labsystems Research Centre. *Studies on Immobilization of Biological Materials. Enhanced Adsorption to Modified Polystyrene*. Helsinki: Labsystems; 1998.
5. Lovborg U. *Guide to Solid Phase Immunoassays*. Roskilde, Denmark: Nunc; 1984.
6. 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.

7. 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.
8. 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.
9. Ochoa R. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. Capítulo 3. En: *Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas*. Ciudad de la Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.31-45.
10. 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*. London: Elsevier; 1993. p.123-49.
11. 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: Elsevier; 1993: p.297-328.
12. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Nuffield Laboratories of Comparative Medicine. London: Dynatech Europe; 1979.

Capítulo 3

Validación de inmunoensayos cuantitativos y cualitativos

Validación. Generalidades

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 que abordamos en el capítulo anterior.

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:

- 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.

A) 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, algunas normas admiten hasta el 20% en la prueba intraensayo. No deben encontrarse diferencias significativas mediante el análisis de varianza.

B) 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 \times 100/valor esperado) y debe encontrarse entre el 90% y 110%. Tomemos como ejemplo 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.

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.

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%.

Una [buena precisión no implica una buena exactitud y viceversa](#), por lo que ambos indicadores deben ser explorados profundamente.

C) 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 capítulos posteriores. 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.
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%.

D) 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.

E) 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 ELISAs 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. Se recomienda el procedimiento de cálculo basado en la evaluación de varias muestras de bajos títulos, la estimación del límite de detección estaría dada por la siguiente fórmula: $LD = 95 \text{ percentil de las mediciones} + 1,65 \text{ (desviación estándar)}$.

F) 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).

G) 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.

H) 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.

I) 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 funcionales 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, como el ensayo bactericida en suero, son analizados como cualitativos y la interpretación de muchos ensayos cuantitativos usados para evaluar la inmunogenicidad, se hace en términos cualitativos al determinar la seroconversión o serorespuesta inducida por una vacuna.

Debemos precisar que un ELISA puede ser cuantitativo o cualitativo. 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:

- 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

A) Sensibilidad

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

B) 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.

C) 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).

D) 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

Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos

E = Especificidad

P = Prevalencia

E) 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.

Procedimiento de cálculo: Para el cálculo de estos indicadores resulta muy útil el uso de [tablas de contingencia](#).

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 McNemar y el más usado [índice Kappa](#):

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 McNemar es empleada cuando se comparan dos métodos con las mismas muestras y las sensibilidades y especificidades pueden aparearse.

F) 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.

La extensión 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 del [gráfico](#) prototipo. 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, como vimos en el capítulo anterior.

Para calcular el valor de corte con respecto a los ensayos de referencia, puede usarse un modelo que tenga 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.

Podemos concluir este capítulo, recalcando la importancia que para el análisis de la inmunogenicidad de vacunas en ensayos clínicos 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, así como en la determinación de la consistencia de los lotes de producción, aplicados a una población determinada y diversos estudios inmunoepidemiológicos.

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.

Bibliografía

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. *A WHO Guide to Good Manufacturing Practice (GMP) Requirements. Part 2: Validation. Validation of Analytical Assays*. Geneva: WHO; 1997. p.65-95.
5. Garret PE, Lasky FD, Meier KL. *User protocol for evaluation of qualitative test performance; approved guideline*. 2nd ed. Vol. 28 No. 3. Wayne, Pensylvania: NCCLS; 2008.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Ochoa R. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. Capítulo 3. En: *Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas*. Ciudad de la Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.31-45.
11. Serret A, Rosales I. *Validación de métodos analíticos. Segundo Taller Nacional de Validación*, Ciudad de La Habana: Grupo Nacional de Validación; 1997.
12. Tholen D, Linnet K, Kondratovich M, Armbruster DA, Garret PA, Jones RL et al. *Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline*. Vol. 24 No. 34. Wayne, Pensylvania: NCCLS; 2004.
13. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Nuffield Laboratories of Comparative Medicine. London: Dynatech Europe; 1979.

Sección II

Ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos

Capítulo 4

Vacunas. Desarrollo actual y tendencias

Vacunas. Definición

Vacuna es el preparado biológico que se inyecta en un organismo con el fin de lograr un estado de inmunidad contra un determinado agente infeccioso o una enfermedad dada. Esta definición engloba tanto las vacunas preventivas actuales, como las terapéuticas que se desarrollan contra enfermedades autoinmunes, neoplasias, alergias y adicciones, entre otras entidades crónicas. Sin embargo, las diseñadas para prevenir las enfermedades infecciosas siguen siendo de gran interés, teniendo en cuenta la disminución de la morbilidad y de la mortalidad que se previenen con su empleo.

La vacunación constituye uno de los mayores logros alcanzados por la salud pública a escala mundial. Con la excepción del suministro estable de agua potable, ninguna otra intervención de salud ha tenido el impacto de la vacunación para reducir la prevalencia de las enfermedades infecciosas. Cada año las vacunas previenen alrededor de 3 millones de muertes y se evitan incapacidades en cerca de 1 millón de niños. Tiene un impacto directo sobre la economía, es la acción de salud con un mejor balance costo-beneficio al disminuir los costos en tratamientos y hospitalizaciones, reducir las incapacidades y por supuesto la improductividad. Los beneficios que se obtienen son a largo plazo y contribuyen activamente no sólo con el [desarrollo económico](#), sino el social.

De este procedimiento se obtiene un resultado colectivo, la inmunidad poblacional, antes llamada de “rebaño”, esencial en la profilaxis de las enfermedades transmisibles, incluso en aquellos individuos que hayan quedado sin proteger por no haber sido inmunizados o por ser no-respondedores o hiporrespondedores ante el estímulo inmunogénico; en ellos la prevención se alcanza al interrumpir la cadena de transmisión.

Clasificación de las vacunas

Se clasifican según los siguientes criterios:

- Su composición.
- Tipo de respuesta inmune inducida.
- Sus objetivos.
- La tecnología de producción empleada.
- La capacidad de autorreplicarse.

Según su composición las vacunas pueden ser de microorganismos enteros o de sus fracciones, independientemente de la tecnología de producción empleada.

Las vacunas pueden inducir preferentemente una respuesta inmune a predominio de la vertiente humoral o celular, o con participación de ambos componentes, lo que está íntimamente relacionado con las características del inmunógeno vacunal; aquellos de gérmenes vivos, inducen una adecuada [inmunidad celular](#), es decir mediada por linfocitos cooperadores CD4+ de la subpoblación Th1, cuya célula efectora final es el macrófago activado, así como por linfocitos citotóxicos (Tc) CD8+. Los compuestos por microorganismos inactivados o sus fracciones, estimulan la [vertiente humoral](#), mediada por anticuerpos, aunque deben distinguirse aquellos que requieren de la participación de linfocitos T cooperadores para la producción apropiada de anticuerpos.

Según sus objetivos, las vacunas pueden ser terapéuticas o preventivas, tal y como describimos al inicio de este capítulo.

La tecnología de producción permite dividir las vacunas en clásicas o modernas, entre las primeras incluimos bacterias o virus vivos atenuados, o inactivados, así como sus fracciones naturales. Las tecnologías modernas abarcan la conjugación de [polisacáridos](#) bacterianos con proteínas portadoras para una respuesta timodependiente, así como la obtención de inmunógenos por recombinación genética y síntesis química, entre otros.

Las vacunas según su capacidad de autorreplicarse pueden dividirse en replicativas o no, este es a nuestro juicio el criterio de clasificación más integral, ya que incluye los anteriores y es además muy útil para evaluar el tipo de respuesta inmune estimulada, teniendo en cuenta que los inmunógenos replicativos se caracterizan por respuestas mediadas por linfocitos Tc, Th y anticuerpos.

Los microorganismos vivos atenuados son ejemplos clásicos de [vacunas replicativas](#). Entre las no replicativas tenemos las vacunas compuestas de microorganismos enteros inactivados y las vacunas de subunidades. Estas últimas pueden ser obtenidas de exotoxinas (toxoides), proteínas, péptidos, glicoproteínas de superficie, polisacáridos capsulares o somáticos externos, vesículas completas de membrana externa, así como otras fracciones. Pueden también ser producidas mediante tecnologías modernas de producción.

Las vacunas génicas pueden a su vez clasificarse como replicativas, como sucede con los microorganismos mutados avirulentos, o no replicativas cuando se utilizan vacunas de ADN “desnudo” o con el empleo de vectores, aunque consideramos que estos últimos pudieran ser considerados replicativos.

Vacunas comercializadas

Para predecir el probable comportamiento de la inmunidad poblacional es necesario conocer las principales [características](#) de las vacunas que actualmente se emplean en los diferentes programas de vacunación.

Un cabal conocimiento de estas vacunas nos permite dirigir los estudios hacia los efectores de la respuesta inmune involucrados, conocer la duración de la inmunidad y por tanto valorar o no la necesidad de refuerzos.

Debe prestarse una particular atención a la estabilidad del producto, para lo que deben seguirse las orientaciones del fabricante. La estabilidad varía según el inmunógeno vacunal; los agentes vivos son menos estables y muy dependientes de la temperatura y las condiciones generales de almacenamiento.

Vacunas en fase de investigación

En los últimos años se han desarrollado [nuevas vacunas](#), aunque desgraciadamente son todavía poco numerosas, están basadas en los novedosos principios de síntesis química y el empleo de vectores; en algunos de estos casos se han cumplido todos los requisitos regulatorios para su comercialización, en otros, como sucede con las vacunas de ADN en las cuales se aplica no el inmunógeno, sino el gen que lo codifica, existe el temor en cuanto a su seguridad, dado por el riesgo de que el ADN administrado se integre en el material cromosómico del hospedero y pueda causar mutaciones, así como la posibilidad de inducción de tolerancia, es decir ausencia de respuesta inmune adecuada ante un inmunógeno específico, o también la producción de reacciones autoinmunes, por lo que se debe probar exhaustivamente la seguridad de estas vacunas. A pesar de esto constituyen una alternativa muy prometedora.

Se prevén además avances notables basados en el empleo de nuevos adyuvantes y métodos de distribución novedosos, tales como vacunas nasales, parches de piel transcutánea y vacunas en plantas transgénicas.

Un atractivo particular de estos nuevos candidatos vacunales lo constituye el estímulo tanto de la inmunidad humoral como la celular, con el objetivo de alcanzar una mejor protección, sobre todo contra agentes intracelulares en los que los mecanismos efectores mediados por linfocitos Th1 y Tc son necesarios para controlar la infección.

Vacunas en el siglo XXI

Las perspectivas de desarrollo en el campo de la vacunología son amplias, basadas en la introducción de las nuevas tecnologías.

Se augura un incremento notable del número de inmunógenos vacunales, nuevas estrategias de inmunización materna y del neonato, y aquellas dirigidas a prevenir enfermedades específicas en dependencia de la edad y el riesgo.

En el caso de los países subdesarrollados, y teniendo en cuenta su cobertura sanitaria, particularidades geográficas, así como el carácter endémico o epidémico de la enfermedad, deberán incluirse vacunas dirigidas contra *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Shigella*, contra la fiebre tifoidea, la malaria y el dengue, entre otras enfermedades. Probablemente deberán también mantener algunas estrategias particulares, como sería el caso de la vacuna oral de virus vivos atenuados contra la poliomielitis (OPV), o el enfoque de esquema combinado IPV + OPV que eliminaría la posibilidad de fallas de inmunidad y disminuiría el riesgo de poliomielitis parálitica asociada a la vacuna oral, que puede producirse al recuperar los virus su neurovirulencia, aunque la tendencia final será la sustitución de la vacuna oral por la parenteral (IPV) como en los países desarrollados.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado las vacunas según sus intereses y las potencialidades de empleo:

- Vacunas usadas con regularidad en el Programa Ampliado de Inmunización: Además de las seis vacunas básicas: contra la poliomielitis, tétanos, difteria, *pertussis*, sarampión y tuberculosis, se emplean vacunas para la prevención de la rubéola, parotiditis, hepatitis B y fiebre amarilla.
- Vacunas disponibles pero no ampliamente utilizadas en los países subdesarrollados: Hib, varicela, encefalitis japonesa, hepatitis A, fiebre tifoidea, vacunas contra neumococos y meningococos.
- Vacunas claves para estos países y que se encuentran en desarrollo o perfeccionamiento: VSR, rotavirus, *Shigella*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Vibrio cholerae*, VIH/SIDA, malaria, esquistosomiasis y dengue.

En el desarrollo de nuevas vacunas debemos destacar la táctica orientada a la prevención de las enfermedades de transmisión sexual, basada en la inmunización tan pronto comienza la vida sexual activa; así como el desarrollo que deberán alcanzar las vacunas contra el cáncer, tanto profilácticas como terapéuticas, que aunque pueden comenzar a aplicarse en edades tempranas, como sucede al inmunizar contra el virus de la hepatitis B o contra el papilomavirus humano, cobrarán una importancia particular en los individuos mayores de 55 años.

El aumento del número de inmunógenos vacunales obligará a incrementar todavía más la valencia de las vacunas combinadas, por lo que deberá estudiarse detalladamente la posible competencia entre los diferentes inmunógenos, determinada de una u otra forma por la inmunodominancia de los distintos epítomos o determinantes antigénicos presentes. Impulsará también el uso de nuevas vías de aplicación, fundamentalmente la de mucosas, y probablemente el empleo de vectores o vacunas de ADN.

En el desarrollo futuro de vacunas se trabaja intensamente en alcanzar una mayor estabilidad sin depender de la cadena de frío, lo que facilitaría la ejecución de programas de vacunación, sobre todo en los países con una economía menos favorecida.

El [porvenir de la vacunación](#) se vislumbra favorable, seremos testigos de una era de nuevas tecnologías y de vacunas novedosas que cambiarán el paradigma al que durante tantos años se ha limitado a las vacunas, que se diseñarán no sólo para la prevención de las enfermedades infecciosas o el tratamiento de las infecciones agudas, sino también en aquellos casos en que el agente ha establecido una infección crónica o latente. Entre los retos mediatos tenemos las vacunas preventivas frente al VIH, la malaria y la tuberculosis.

Entre los candidatos para la vacunación terapéutica incluimos al VIH, el herpes simple y *Helicobacter pylori*. Veremos también un auge en el desarrollo de vacunas para la profilaxis y la terapéutica de un gran número de enfermedades no infecciosas.

Bibliografía

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai SH, editores: Inmunidad frente a los microorganismos. Capítulo 15. En: *Inmunología Celular y Molecular*, 6ta ed., Madrid: Elsevier; 2008, pp.351-73.
2. National Institutes of Health (US). *The Jordan Report 2000. Accelerated Development of Vaccines*. Bethesda: The National Institutes of Health; 2007.
3. Ochoa R, Sierra G, Martínez I, Cuevas I. Mecanismos de defensa frente a las infecciones (I). Fases de reconocimiento y activación de la respuesta inmune. Capítulo 2 En: *Prevención de la enfermedad meningocócica*. Ciudad de La Habana. Finlay Ediciones; 2010. p.31-41.
4. Ochoa R, Sierra G, Martínez I, Cuevas I. Mecanismos de defensa frente a las infecciones (II). Fase efectora de la respuesta inmune. Capítulo 3. En: *Prevención de la enfermedad meningocócica*. Ciudad de La Habana. Finlay Ediciones; 2010. p.43-57.
5. Ochoa R. Bosquejo del sistema inmune en la defensa frente a infecciones. Capítulo 2. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.5-23.
6. Ochoa R. Vacunas. Desarrollo actual y tendencias. Capítulo 3. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.24-30.
7. Plotkin SA. Vacunas en el siglo veintiuno. *Vacunas* 2002;3:18-28.
8. Salleras L. Tecnologías de producción de vacunas I: vacunas vivas atenuadas. *Vacunas* 2002;3:29-33.
9. Salleras L. Tecnologías de producción de vacunas II: vacunas inactivadas. *Vacunas* 2002;3:78-84.
10. Salleras L. Tecnologías de producción de vacunas III: vacunas génicas. *Vacunas* 2002;3:145-49.
11. World Health Organization. *State of the world's vaccines and immunization*. Geneva: The World Health Organization; 2010.

Capítulo 5

Evaluación de la inmunogenicidad en el desarrollo clínico de vacunas preventivas

Ensayos clínicos de vacunas preventivas. Clasificación

El desarrollo de una vacuna se inicia desde el momento en que surge la idea 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 o años, se inicia la etapa de investigación clínica en seres humanos.

Los “ensayos clínicos de vacunas” son 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.

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 (por ejemplo, estudios fase I/II, fase II/III). De forma muy breve expondremos sus características y el papel que juega la evaluación de la [inmunogenicidad](#) en ellas.

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. 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 primordial estudiar la inmunogenicidad, lo que caracteriza esta fase, aunque no limitada a ella. Además, se evalúa el esquema de inmunización, la reactogenicidad y duración de la protección, relacionados con variables como edad, sexo u otras en centenares de voluntarios, 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 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 miles de personas, 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, sobre todo en el caso de candidatos vacunales que cuenten con comparadores activos de similar composición y con un diseño estadístico de no-inferioridad. 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 efectividad como su seguridad, ya que las diferencias individuales pueden provocar respuestas inmunes inadecuadas y reacciones adversas no detectadas durante los ensayos clínicos precedentes, 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, usualmente inferior a la observada en los estudios experimentales.

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.

Características generales de los estudios de inmunogenicidad

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, enfermedades crónicas 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, como describiremos en los “criterios de evaluación”.
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 sus componentes por separado. Cuando se cuenta con una vacuna multivalente comercial de igual composición, puede usarse como comparador activo para cada uno de los inmunógenos evaluados.

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.

Por último, recalcar que no debe verse la evaluación de la inmunogenicidad como un elemento aislado en el desarrollo clínico de vacunas, sino imbricado de forma indisoluble con el resto de sus componentes.

Reporte de los resultados

El reporte de los resultados de las técnicas de laboratorio usadas para evaluar la inmunogenicidad de vacunas, puede darse en forma **cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa**; aunque siempre es preferible diseñar ensayos cuantitativos, en particular cuando se emplea el ELISA, aun cuando la interpretación final en algunos casos se realice en términos cualitativos al determinar la seroconversión inducida por una vacuna.

El desarrollo de técnicas cuantitativas se basa en curvas “dosis/respuesta”, lo que es difícil, ya que las curvas de calibración son sigmoidales, y su parte más sensible es la pequeña zona de mayor pendiente, como profundizaremos en el siguiente acápite. Además de esta limitación, las curvas de anticuerpos son complicadas ya que son difíciles de describir con la ley de acción de masas, porque no es predecible la avidez ni la cantidad real de los inmunoreactantes.

Métodos para expresar los resultados de las técnicas inmunoenzimáticas

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 sigmoidal. Es un método más exacto pero muy trabajoso.
3. **Valor de lectura.** Los resultados habitualmente son expresados en valores de absorbancia cuando se usan sustratos cromogénicos, o en unidades arbitrarias de fluorescencia cuando se emplean sustratos 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 o puntos de una curva, 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 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 los resultados

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 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, técnica de gran precisión, para las cuales duplicar los valores de actividad o concentración pudiera ser suficiente.

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 teniendo en cuenta que los efectores de la respuesta inmune en un contexto poblacional se distribuyen generalmente de forma no-Gaussiana 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. En ocasiones puede establecerse un gradiente de concentración que permite clasificar a los individuos por grado de protección, como se obtiene con los ELISAs para cuantificar antitoxina tetánica o diftérica, o anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. 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, deben estimarse los intervalos de confianza de proporciones.

Las pruebas de hipótesis se emplean también con el objetivo de determinar la existencia o no de diferencias significativas para un grado de probabilidad determinado, generalmente del

5%, en diferentes tiempos de un estudio longitudinal o cuando se comparan diferentes muestras. 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 comparados son estadísticamente similares según los enunciados establecidos en cada caso.

Sin embargo, 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.

Bibliografía

1. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Assessment of efficacy. Part 3. En: *Note for Guidance on Clinical Evaluation of New Vaccines*. London: EMEA; 1999. p.3-7.
2. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Methodological considerations. Part 4. En: *Note for Guidance on Clinical Evaluation of New Vaccines*. London: EMEA; 1999. p.7-11.
3. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Special considerations for combined vaccines. Part 5. En: *Note for Guidance on Clinical Evaluation of New Vaccines*. London: EMEA; 1999. p.11-12.
4. Ochoa R, Baró IM, Menéndez J, Triana T, Mirabal M, Armesto M, et al. Reactogenicidad e inmunogenicidad de una nueva vacuna de toxoide tetánico y diftérico con concentración reducida en adolescentes cubanos. *VacciMonitor* 2006;15(2):13-7.
5. 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.
6. Ochoa R. Evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas preventivas. Capítulo 5. En: *Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.68-82.
7. Ochoa R. Importancia de la inmunoepidemiología en la vacunología. Capítulo 6. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.49-57.
8. Ochoa R. Principales técnicas de laboratorio para explorar la inmunidad poblacional. Capítulo 5. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.39-48.

9. Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. “Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods to Quantitate *Neisseria Meningitidis* Group A ride Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”, *J Polysaccha Clin Microbiol* 1991;29:1439-46.
10. 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. p.385-421.
11. Uranga R, Mirabal M. Elementos esenciales a considerar en los ensayos de no inferioridad. *VacciMonitor* 2006;15(3):21-4.
12. World Health Organization. Clinical evaluation of vaccines. Part B. En: *Annex 1. Guidelines on Clinical Evaluation of Vaccines. Regulatory Expectations*, Geneva: The World Health Organization; 2004. p. 55-92.
13. World Health Organization. Preclinical and laboratory evaluation of vaccines. Part A. En: *Annex 1. Guidelines on Clinical Evaluation of Vaccines. Regulatory Expectations*, Geneva: The World Health Organization; 2004. p.49-54.

Capítulo 6

Importancia de la inmunoepidemiología en la prevención de enfermedades infecciosas

Inmunoepidemiología. Disciplina integradora

La inmunoepidemiología no es una simple unión formal entre la inmunología y la epidemiología, la primera enfocada al estudio de la inmunidad y la segunda orientada fundamentalmente hacia poblaciones más bien que a los individuos.

La inmunoepidemiología, que incluye la seroepidemiología como una subdisciplina, está orientada a la vigilancia de las enfermedades e investiga la influencia de la inmunidad poblacional sobre diferentes patrones epidemiológicos. El chequeo de esta inmunidad a intervalos regulares permite la estimación del impacto social, médico y económico de las enfermedades, sobre todo las infecciosas; la planificación y evaluación de los programas de intervención, el reconocimiento rápido y la investigación de las enfermedades emergentes, así como el descubrimiento de genotipos resistentes a los mecanismos inmunes.

Esta nueva disciplina, aunque surgió de los estudios sobre infecciones parasitarias, se ha extendido al estudio del comportamiento de la inmunidad ante diferentes microorganismos, así como hacia las enfermedades no transmisibles. Sin embargo, la inmunoepidemiología es especialmente útil para la evaluación y el control de las enfermedades prevenibles por vacunas.

La inmunidad poblacional ante un agente biológico en particular es un importante factor a tener en cuenta para evaluar el comportamiento de una enfermedad infecciosa. Otros factores incluyen la vía de transmisión, el genotipo del agente y su patogenicidad, incluyendo la evasión de los mecanismos inmunes. Por otra parte, la inmunidad depende en gran medida de la composición genética de la población, sus condiciones socioeconómicas, historias previas de infecciones, así como la existencia o no de eficaces programas de vacunación.

Para el desarrollo de esta disciplina es importante saber los mecanismos celulares y moleculares relacionados con la infección, que permitan reconocer la inmunidad adquirida por la vacunación o la existente en individuos recuperados, así como los mediadores de la respuesta inmune presentes en la fase aguda de la enfermedad. También es necesario tener en cuenta las características de la infección, entre las que se destacan la intensidad del estímulo inmunogénico, la vía de transmisión, la mezcla o no de genotipos y la presencia o no de reactividad cruzada y competencia entre diferentes cepas.

La inmunidad poblacional depende de la individual, de ahí que sea necesario definir los marcadores inmunológicos apropiados que se correlacionen con la protección o con la reducción de la infectividad del microorganismo o su transmisión. Para ello, es necesario comprender detalladamente la relación causa–efecto entre los mecanismos de defensa del hospedero y la infección producida por un agente biológico.

Los estudios inmunoepidemiológicos pueden ser transversales o longitudinales; los primeros son útiles para evaluar la inmunidad inducida por vacunación, así como por infecciones bacterianas o virales en las que la presencia de anticuerpos indique infección pasada y recuperación. Sin embargo, en el caso de infecciones parasitarias se sugiere el empleo de estudios longitudinales, teniendo en cuenta su persistencia, sus bajos niveles de inmunidad y la variación antigénica que modifica la respuesta inmune. Los estudios longitudinales son también útiles en la evaluación de infecciones por otros agentes infecciosos con características similares a las descritas, así como para la predicción de la duración de la inmunidad inducida de forma natural o artificial.

La inmunoepidemiología depende en gran medida del desarrollo y el empleo de métodos matemáticos y estadísticos complejos, ya que el sistema inmune se comporta habitualmente de forma no-lineal y con distribuciones no-Gaussianas, acentuado por múltiples efectos de interacción entre los propios elementos del sistema, el agente biológico y el medio ambiente.

Mediante la combinación de la inmunología y la epidemiología se puede estimar el papel real de la inmunidad en la prevención de enfermedades, distinguir entre la exposición al agente infeccioso y la enfermedad, así como explicar su comportamiento epidemiológico.

Una minuciosa comprensión de la inmunidad adquirida por vacunas o por la infección, así como de las implicaciones sobre la cadena de transmisión y los mecanismos de resistencia contra los efectores del sistema inmune es importante para la planificación de programas efectivos de intervención.

Inmunoepidemiología y estrategias de vacunación

La decisión de incluir determinadas vacunas en los programas de inmunización depende de una u otra forma de las características inmunes de la población, propiedades del agente infeccioso, su circulación, las probabilidades de diseminación, así como la existencia de medidas de control apropiadas y el entorno político, económico, geográfico, raíces culturales y nivel educacional.

Sin embargo, el estudio de la inmunidad poblacional es imprescindible para evaluar la eficacia de un esquema de vacunación establecido, definir la necesidad de modificar los protocolos primarios de inmunización, incluir refuerzos apropiados, o disminuir la periodicidad de su aplicación.

La selección de un inmunógeno vacunal está relacionada con la vertiente del sistema inmune más idónea para prevenir la infección, incluyendo los mecanismos implicados en la vía de entrada del agente biológico y los órganos diana. De todo ello depende la metodología que debe emplearse para el control de la inmunidad.

La inmunoepidemiología cobra una particular importancia cuando se observa que la respuesta contra inmunógenos obtenidos de cepas con un genotipo determinado induce insuficiente reactividad cruzada; en estos casos debe incrementarse la vigilancia dirigida a la circulación de otras cepas del mismo microorganismo, con peligro potencial de epidemias, y por otra parte orienta a la selección de una cepa vacunal más apropiada. Debe también controlarse la ocupación del nicho ecológico por otros gérmenes, una vez alcanzada la inmunidad posvacunación, incluido los casos en que se elimine el estado de portador.

En determinadas circunstancias puede surgir la necesidad de modificar los programas de vacunación existentes, mediante la sustitución de unas vacunas por otras con características diferentes; según las condiciones particulares de un país o región, el agente, su patogenicidad y la inmunidad que se desee inducir, de mucosa o sistémica, con timodependencia, a predominio de la inmunidad humoral o celular. Es el caso de las estrategias diferentes contra la poliomielitis, en que los países desarrollados, con elevadas coberturas de inmunización, han incluido la vacuna IPV combinada con otros inmunógenos, para, como ya se discutió en capítulos precedentes, disminuir los riesgos de parálisis inducida por la OPV, que por otra parte continúa siendo la más empleada en los países subdesarrollados para eliminar este flagelo, vacuna de fácil aplicación e inductora de una excelente inmunidad de mucosas, acorde con la vía de entrada del poliovirus.

Inmunoepidemiología en la emergencia y reemergencia de enfermedades

La vigilancia inmunoepidemiológica es útil para el análisis de la emergencia y reemergencia de enfermedades. En la prevención de estas últimas es vital la detección de grupos susceptibles para de esta forma emplear el arsenal inmunoprofiláctico pertinente.

Se entiende por enfermedades reemergentes aquellas que en su momento dejaron de ser un problema de salud producto de los progresos en su control y prevención y que al romperse el equilibrio entre el agente causal y estas medidas, debido a: pérdida de inmunidad, resistencia antibiótica, detrimento de los sistemas de salud o al cambio climático, surgen nueva y habitualmente de forma más severa o con características cualitativas diferentes, lo que constituye un serio problema de salud. Para el mundo actual es una preocupación la aparición de enfermedades reemergentes prevenibles por vacunación. La importancia de la inmunoepidemiología en la vacunología puede ser mejor comprendida al analizar la reemergencia de la difteria.

La difteria es una enfermedad bacteriana en la que las manifestaciones clínicas resultan de la acción de una sustancia extracelular (exotoxina) producida por *Corynebacterium diphtheriae*. Esta enfermedad es adquirida a través del contacto personal. La letalidad de la

difteria se debe a su toxina y la inmunidad contra la misma es mediada por anticuerpos, principalmente de clase IgG contra la toxina, a los cuales se les llama antitoxina.

Esta enfermedad puede aparecer también en personas previamente vacunadas, de aquí que el conocimiento de la duración de la inmunidad sea de crucial importancia para el diseño de programas de vacunación efectivos.

Para la difteria existe una buena correlación entre la protección clínica y la presencia de antitoxina en suero, ya sea por la enfermedad, el estado de portador o por la inmunización con el toxoide. Por técnicas de neutralización *in vivo*, se consideran absolutamente no protectores las concentraciones de anticuerpos menores de 0,01 UI/mL (Unidad Internacional por mililitro). Niveles no adecuados o no confiables para conferir protección entre 0,01 y 0,10 UI/mL; de ahí que usualmente se emplee como valor para el análisis el umbral de 0,10 UI/mL, sobre todo cuando se utilizan técnicas inmunoenzimáticas para su evaluación; mientras que son necesarios títulos mayores (>0,10 UI/mL) para una protección confiable. La mayor parte de los autores considera que los niveles >1,0 UI/mL corresponden a una protección confiable de larga duración.

En la aparición de brotes epidémicos han incidido varios factores, entre ellos la ausencia de un adecuado nivel inmunitario en la población, la magnitud de la exposición y virulencia del bacilo de la difteria, así como la deficiente situación socioeconómica, que por una parte limita las campañas de vacunación y por otro hace críticas las medidas higiénico-epidemiológicas necesarias para limitar la enfermedad. De ahí que la difteria, como enfermedad, estuviera restringida por mucho tiempo a la población menor de 15 años en los países subdesarrollados.

Se puede decir que los que sobreviven a esta enfermedad en los países más pobres adquieren la inmunidad de forma natural, la cual se mantiene por la exposición antigénica continuada, por lo que prácticamente no aparecen brotes epidémicos más allá de la adolescencia. Sin embargo, en los países industrializados, los altos niveles de inmunización en niños han provocado la disminución de la circulación del *C. diphtheriae*, por lo que hay menos posibilidades de reforzar la inmunidad por exposición natural, apareciendo grupos de individuos adultos no inmunes con condiciones ideales para brotes epidémicos.

En las décadas de 1980 y 1990 se detectó que en algunos países industrializados, menos del 50% de los adultos presentaban una adecuada inmunidad contra la difteria. Los grupos de edad con los valores más bajos de antitoxina diftérica correspondían a los adultos entre 20 y 40 años de edad en Alemania y Japón, los de 40 a 50 años en Australia e Inglaterra y en los mayores de 50 años en Dinamarca, Finlandia, Suecia y EUA. A pesar de ello no ocurrieron brotes epidémicos en estos países, lo que está relacionado con condiciones económicas favorables y la inmediata implementación de un programa de vacunación con la formulación para adultos de la vacuna bivalente de toxoide tetánico y diftérico. Sin embargo, en las antiguas repúblicas soviéticas, principalmente en la Federación Rusa, ocurrieron brotes epidémicos de difteria, que se asociaron principalmente a los bajos niveles de inmunidad de

estas poblaciones. Estos brotes se expandieron como pólvora a los países vecinos de Europa Oriental.

En estos países disminuyó la cobertura de inmunización, quedando la población infantil desprotegida. También quedaron vulnerables los adultos, que perdieron su inmunidad como consecuencia de los programas de inmunización vigentes durante el período socialista. En esa etapa prácticamente se suprimió la circulación del *C. diphtheriae* y por ende la estimulación natural, que sí está presente en los países del Tercer Mundo. Esta circunstancia es contradictoria, ya que al disminuir la inmunidad en la población adulta, junto al deterioro de las condiciones sanitarias derivadas de la situación socioeconómica, relacionadas entre otras causas con el incremento del movimiento de la población desde áreas rurales hacia la urbana, los conflictos bélicos, el hacinamiento, la falta de higiene y puestos en contacto con la bacteria, crearon el medio óptimo para la diseminación de enfermedades. En 1980 Europa era responsable de menos del 1% del total de casos mundiales de difteria. En 1994 reportó cerca del 90% de los casos, la inmensa mayoría en la Federación Rusa (80%) y otros países de la antigua URSS y del este europeo.

En épocas precedentes se crearon condiciones similares que nos permitieron comprender la influencia de estos factores de riesgo en brotes de diferentes enfermedades. La peste bubónica diezmo la Europa Medieval. En la Primera Guerra Mundial se solapó otro conflicto, entre el virus de la influenza y la humanidad, en el que murieron millones de personas. En Cuba, la reconcentración en la Guerra de Independencia desató en 1898 una gran epidemia de cólera en La Habana, en la que murieron un sinnúmero de personas.

Si analizamos el comportamiento de la difteria en Cuba, se puede apreciar que en la etapa prerrevolucionaria la difteria constituía un azote en la población infantil, dada las pésimas condiciones en la infraestructura socioeconómica prevaleciente en la mayoría de la población. En la etapa revolucionaria se establecen estadísticas confiables, observándose en 1962 elevados valores de morbilidad (1469 enfermos) y mortalidad (75 fallecidos), año en el que se iniciaron las campañas de vacunación. En 1964 la cobertura de inmunización ascendió al 60%, en 1970 sólo se reportaron 7 casos de difteria con 1 fallecido, y ya en 1974 la vacunación abarcó al 75–80% de la población. A partir de 1980 no se reportan enfermos ni muertes por difteria como consecuencia de la política inmunitaria y otras medidas de control. Es interesante observar cómo el aumento de la cobertura de inmunización y del control epidemiológico, se traduce en cambios progresivos, dados por una disminución primero de la morbilidad y mortalidad y luego desaparición de la enfermedad.

La ausencia de la enfermedad en Cuba propicia la pérdida de la reestimulación natural y la aparición de individuos no inmunes, tal y como sucedió en aquellos países con políticas de inmunización similares; si a ello añadimos que en el último decenio del siglo XX se introdujeron cambios notables en prácticamente todas las esferas de la sociedad, dada por las dificultades económicas y las sociales como consecuencia de la desaparición del Campo Socialista Europeo, la URSS y el bloqueo económico, impuesto por Estados Unidos, es fácil comprender la necesidad de conocer la existencia o no de poblaciones vulnerables, para lo cual se diseñaron diferentes estudios seroepidemiológicos.

En 1999 se estudió una muestra representativa de la población del municipio Alquizar, en la actual provincia Artemisa. Se encontró un alto nivel de [inmunidad contra la difteria](#) en las primeras edades, atribuido a la alta cobertura de vacunación hasta los 5–6 años de edad, que sin embargo no cubre las edades superiores acorde con nuestro esquema nacional. Se detectó que el 29,05% de los individuos mayores de 20 años no estaban protegidos adecuadamente y sólo el 4,53% poseían una protección de larga duración. En contraste, la [protección contra el tétanos](#) fue excelente, resultado coherente con el esquema de vacunación, que incluye refuerzos periódicos.

Durante el año 2002 se evaluó una muestra de recién nacidos en La Habana. Se encontró una inmunidad confiable antidiftérica tan sólo en el 48,88% de los recién nacidos, de estos, únicamente el 1,29% con respuesta de larga duración. La escasa inmunidad antidiftérica en los recién nacidos refleja las deficiencias en la transferencia de anticuerpos a través de la placenta, y por ende una insuficiente inmunidad en sus madres.

En el año 2001 se realizó un estudio en niños cubanos entre 1 y 5 años de edad, seleccionados de todas las provincias de Cuba. Los menores valores de antitoxina, tanto para el [tétanos](#) como la [difteria](#), se observaron antes del refuerzo con la vacuna bivalente difteria/tétanos, que se aplica en el primer grado escolar y que corresponde a los 5 o 6 años de edad. En el grupo que recibió el refuerzo, se detectó una excelente seroprotección para ambas enfermedades. Esta investigación demuestra que los niveles de antitoxina [tetánica](#) y [diftérica](#) en niños preescolares cubanos son adecuados y avalan la estrategia de vacunación empleada en esta población, lo que difiere con los resultados observados en los adultos.

Podemos concluir acerca de estos estudios que las condiciones que pueden propiciar la aparición de la difteria como una enfermedad reemergente justifica la modificación de la política inmunitaria cubana, mediante la sustitución de los refuerzos con toxoide tetánico a partir de la adolescencia, por la bivalente para adultos de toxoide tetánico y diftérico en el Esquema Oficial de Vacunación de la República de Cuba.

En los últimos años se han reportado casos de tos ferina en la población adulta, por lo que se sugiere agregar componentes de *Bordetella pertussis* a la vacuna bivalente, para evitar la reemergencia de dicha enfermedad.

Inmunoepidemiología y predicción de la inmunidad

La inmunoepidemiología no sólo es importante en el diagnóstico puntual de la inmunidad poblacional, sino en la predicción del comportamiento longitudinal de la inmunidad luego de la exposición inmunogénica.

Para una estimación aproximada de la inmunidad poblacional es necesario tener en cuenta las características del inmunógeno vacunal, la vertiente del sistema inmune preferentemente estimulada, la timodependencia o no de la respuesta inducida e incluso la clase y subclase de inmunoglobulinas que se producen. Las condiciones medioambientales, fundamentalmente

las inherentes al hospedero y la influencia del resto de sus componentes sobre el mismo, deben también ser valorados a profundidad.

El empleo de modelos matemáticos es esencial para este fin, sin embargo, resulta muy difícil su diseño, teniendo en cuenta el carácter no-lineal de la respuesta inmune, basada precisamente en la individualidad que la caracteriza y las particularidades del entorno que inciden activamente sobre este sistema. Se requieren, por tanto, cálculos complejos, no necesariamente representativos de toda la población de un país, región o área geográfica determinada, lo que constituye una limitante. La definición de estos modelos constituye un reto necesario, ya que nos permitiría evaluar con gran antelación los riesgos de enfermedad y decidir las adecuadas medidas de intervención, incluyendo la inmunización profiláctica, lo que sería muy útil en la organización de los servicios de salud. Pudieran también establecerse para pronosticar la evolución de la infección bajo la influencia de la respuesta inmune en el caso de vacunas terapéuticas.

La inmunización materna y la predicción del paso transplacentario de anticuerpos son también necesarias para el control de las enfermedades inmunoprevenibles durante los primeros meses de vida, en los que el sistema inmune no ha madurado completamente. La placenta humana regula la transferencia de anticuerpos de la madre al feto, la que es fundamentalmente mediada por transporte activo, en el que el receptor Fc- γ neonatal, identificado y caracterizado en células trofoblásticas humanas, desempeña un papel esencial.

La magnitud de transferencia de anticuerpos reportada es variable y depende entre otros aspectos del estado inmune de la madre, relacionado a su vez con diferentes elementos medioambientales, así como del nivel de desarrollo fetal. Se ha demostrado que existe correlación entre la transferencia de IgG y la edad gestacional. La mayor concentración de anticuerpos maternos se adquiere durante el tercer trimestre del embarazo, por lo que en los partos pretérminos se alcanzan bajos niveles de IgG en el recién nacido, lo que contribuye a su vulnerabilidad a las infecciones. También se ha observado que las deficiencias nutricionales en las embarazadas pueden provocar una inmunodeficiencia secundaria, factor de riesgo que incrementa también las posibilidades de infección en el recién nacido.

Por todo ello resulta particularmente complejo el desarrollo de modelos matemáticos para pronosticar *a priori* con exactitud los niveles de IgG presentes en el neonato, aunque es generalmente aceptado que hay una relación directamente proporcional entre los niveles de anticuerpos de la madre y los del recién nacido, en lo cual se ha basado el control del tétanos neonatal.

En un estudio realizado durante el año 2004 en La Habana, se observó una correspondencia entre los niveles de anticuerpos de la pareja madre/recién nacido. Los elevados niveles de [antitoxina tetánica](#) se relacionaron con el refuerzo de toxoide tetánico en las embarazadas. Los niveles de [antitoxina diftérica](#) fueron inferiores, aunque proporcionales.

Es necesario recalcar que la inmunización materna como estrategia de intervención puede extenderse hacia otras enfermedades.

Inmunoepidemiología y ensayos clínicos de vacunas

La inmunoepidemiología es necesaria para caracterizar la población blanco del candidato vacunal, de extrema importancia tanto para el desarrollo farmacológico como para la estimación preliminar de esquemas, así como para una evaluación más objetiva del tamaño muestral y la evaluación de los resultados obtenidos en los ensayos clínicos. Por otra parte, está íntimamente relacionada con los controles que deben establecerse una vez aprobada una vacuna para su comercialización, lo que se ha dado en llamar estudios de poslicenciamiento o poscomercialización (fase IV), que incluyen la evaluación de la seguridad, la efectividad y la respuesta inmune inducida por la vacuna en esas condiciones.

La inmunoepidemiología nos aporta una información vital para la vacunología. No pueden desarrollarse vacunas sin definir el inmunógeno apropiado, la respuesta inmune necesaria acorde con la infectividad del microorganismo, y sin conocer el estado inmune de una población dada. Es necesaria para definir estrategias de vacunación, para su evaluación periódica, así como la detección de grupos susceptibles. Constituye, además, una herramienta de medición en los ensayos clínicos de vacunas.

Bibliografía

1. 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.
2. Galazka AM, Robertson SE. Immunization against diphtheria with special emphasis on immunization of adults. *Vaccine* 1996;14:845-57.
3. Greenwood B. Maternal immunisation in developing countries. *Vaccine* 2003;21:3436-41.
4. Hellriegel B. Immunoepidemiology - bridging the gap between immunology and epidemiology. *Trends Parasitol* 2001;17:102-6.
5. Malek A. Ex vivo human placenta models: transport of immunoglobulin G and its subclasses. *Vaccine* 2003;21:3362-4.
6. Maple PA, Jones CS, Wall EC, Vyseb A, Edmunds WJ, Andrews NJ, et al. Immunity to diphtheria and tetanus in England and Wales. *Vaccine* 2000;19:167-73.
7. Ministerio de Salud Pública de Cuba. *Anuario Estadístico de Salud 2010*. La Habana: MINSAP; 2010.
8. 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.
9. Ochoa R. Importancia de la inmunoepidemiología en la vacunología. Capítulo 6. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.49-57.

10. Ochoa R. La inmunoepidemiología. Objeto de estudio. Capítulo 1. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p.1-4.
11. Ochoa RF, Acosta J, Ferriol XR, Ginebra M. Evaluación de anticuerpos contra enfermedades prevenibles por vacunas en el binomio madre-recién nacido en hospitales de Ciudad de La Habana. *VacciMonitor* 2007;16(2):16-20.
12. Ochoa RF, Martínez JC, Ferriol XR, Sotolongo FT. Niveles de antitoxina tetánica y diftérica en recién nacidos y niños preescolares cubanos. *Revista Cubana Med Trop* 2006;58(1):44-9.
13. Peña GL. Seroprevalencia de antitoxina diftérica y tetánica en la población de Alquizar. (Tesis para optar por el título de Especialista de I Grado en MGI). Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana; 1999.
14. Vandelaer J, Birmingham M, Gasse F, Kurian M, Shaw C, Garnier S. Tetanus in developing countries: an update on the maternal and neonatal tetanus elimination initiative. *Vaccine* 2003;21:3442-5.

Epílogo

Los ensayos clínicos de vacunas necesitan de técnicas *in vitro* para evaluar la inmunogenicidad del candidato vacunal y de sus controles, así como estimar su eficacia serológica. Los estudios inmunoepidemiológicos requieren también de métodos apropiados para estudiar la inmunidad poblacional.

Por otra parte, el diagnóstico etiológico complementa estas investigaciones. Tomemos como ejemplo los estudios de eficacia evaluados mediante la ocurrencia de casos de la enfermedad de interés u otra condición asociada al agente causal, como el estado de portador o infección subclínica.

El diagnóstico de la enfermedad infecciosa de interés puede hacerse por métodos directos: mediante la visualización, el aislamiento e identificación del agente o mediante la detección de sus antígenos, metabolitos u otros componentes estructurales. También pueden emplearse métodos indirectos, en los cuales se valora la respuesta inmune frente al microorganismo; en este caso hay que distinguir entre la respuesta inducida por la vacunación, por la exposición al agente infeccioso, o reactividad cruzada con otros agentes biológicos.

Entre todas las técnicas empleadas, el ELISA es aún una pieza clave para evaluar la inmunidad poblacional, la respuesta inmune inducida por vacunas, o con fines diagnósticos. El desarrollo de esta técnica es imprescindible si se quiere contar con instrumentos adecuados y que garanticen la reproducibilidad de los resultados. Para ello se requiere de una adecuada estandarización y validación.

Si se logra un ensayo cuantitativo, con correlatos de protección, el ELISA por sus ventajas, resulta una técnica insustituible para evaluar la inmunogenicidad de vacunas y su aplicación en estudios inmunoepidemiológicos.

Glosario

Adyuvante: Compuesto capaz de potenciar una respuesta inmunitaria.

Aleatorización (randomización): Utilizar un método disciplinado de sorteo o azar para asignar el producto o el placebo a los sujetos incluidos en un ensayo clínico de modo que cada sujeto tenga exactamente las mismas probabilidades de formar parte de uno u otro grupo de tratamiento.

Memoria inmunológica: Una respuesta cualitativamente superior ante la segunda administración de un inmunógeno dado.

Anticuerpo: Proteína producida como resultado de la introducción de algún inmunógeno y que tiene la capacidad para combinarse con el que estimuló su producción.

Antígeno: Sustancia que se combina con los efectores de la respuesta inmune.

Células presentadoras de antígenos: Células que cooperan con los linfocitos T y B en la formación de anticuerpos y de otras reacciones inmunitarias. Entre ellas se destacan las células de Langerhans y los macrófagos.

Células naturales asesinas (NK en Inglés): Células que producen citotoxicidad celular sin sensibilización previa.

Células B: Linfocitos B, células derivadas de la Bursa de Fabricio en las aves y, por analogía, células equivalentes a las derivadas de la médula ósea en el hombre. Estas células son precursoras de las células plasmáticas.

Células plasmáticas: Células sintetizadoras de anticuerpos totalmente diferenciadas que provienen de los linfocitos B.

Células T (linfocitos T): Células derivadas del timo que participan en diversas reacciones inmunitarias.

Células T auxiliares o cooperadoras (Helper en inglés): Subtipo de linfocitos T que cooperan con las células B en la formación de anticuerpos, y participan en otras reacciones inmunitarias.

Citocinas: Moléculas producidas por diversos tipos celulares, que actúan sobre ellas mismas y otras células.

Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC en inglés): Forma de citotoxicidad en la cual algunas células efectoras destruyen células blanco recubiertas de anticuerpos.

Clase de inmunoglobulina: Subdivisión de las moléculas de inmunoglobulinas, basada en los determinantes antigénicos de la región Fc de las cadenas pesadas. En el hombre hay 5 clases designadas como: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

Complemento: Sistema de proteínas séricas que es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo.

Correlato de protección: Término utilizado para consignar que existe un título de anticuerpos definido, que se corresponde con la protección clínica de una vacuna. No todas las vacunas lo tienen descrito.

Desarrollo clínico de un producto: Es un proceso escalonado y sucesivo que implica un conjunto de estudios, tareas y decisiones, que debe tener una sólida base científica, necesario para obtener información de seguridad y eficacia de un nuevo producto en humanos, el cual es imprescindible para solicitar su registro y futura comercialización.

Detectabilidad: O límite de detección, es la menor cantidad de analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas. La concentración mínima de una sustancia que genera una respuesta consistentemente mayor que el fondo del ensayo.

Efectividad vacunal: Grado en que una intervención, en este caso una vacuna, origina un resultado beneficioso en la práctica habitual. En vacunación es también el efecto protector directo debido a la aplicación de la vacuna más el efecto indirecto aportado por la inmunidad poblacional o colectiva.

Eficacia: Es la capacidad general de un inmunoensayo para detectar correctamente todos los positivos y los negativos.

Eficacia vacunal: Grado en que una intervención, en este caso una vacuna, origina un resultado beneficioso (protección contra una infección determinada) en un ensayo clínico que se realiza en condiciones ideales de investigación.

ELISA: Del inglés “Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay”, ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida.

Enfermedad autoinmune: Manifestación clínico patológica causada por reacciones autoinmunes, no fisiológicas, que causan daño a células, tejidos u órganos del propio individuo. Se produce al perderse la autotolerancia.

Enfermedad reemergente: Son aquellas que en su momento dejaron de ser un problema de salud producto de los progresos en su control y prevención y que al romperse el equilibrio entre el agente causal y estas medidas, debido a: pérdida de inmunidad, resistencia antibiótica, detrimento de los sistemas de salud o al cambio climático, surgen nueva y habitualmente de forma más severa o con características cualitativas diferentes.

Especificidad: Proporción de muestras negativas (no reactivas) correctamente identificadas.

Estudio de no inferioridad: Ensayo encaminado a demostrar que una intervención (medicamento o vacuna) no es inferior o peor que otro que posee una eficacia demostrada.

Estudio de superioridad: Ensayo diseñado para demostrar que una intervención (medicamento o vacuna) es superior o mejor que otro que posee una eficacia demostrada.

Estudio reto: Ensayo especial que debe realizarse en condiciones muy bien controladas ya que implica exponer al voluntario a un microorganismo o sustancia tóxica para lo cual puede o no estar protegido. En vacunas permite caracterizar la eficacia o la capacidad protectora del producto en investigación.

Evento adverso: Cualquier acontecimiento médico desfavorable que se presenta en un paciente o sujeto de investigación clínica al que se administra un producto farmacéutico, y que no tiene necesariamente una relación causal con este tratamiento. Un acontecimiento o evento adverso puede ser, por tanto, cualquier síntoma o signo desfavorable (incluyendo un hallazgo de laboratorio anormal), o enfermedad temporalmente asociada con el uso de un producto en investigación, esté o no relacionado con este producto.

Exactitud: Es el grado de identidad de los valores analíticos obtenidos con cierto método y el contenido real del analito en la muestra.

Fagocitosis: Ingestión de microorganismos o de otras partículas por los fagocitos.

Grupo Control: En un ensayo clínico es el grupo que sirve como patrón de comparación porque no ha recibido la intervención o el tratamiento de interés. Si recibe un tratamiento similar, ya conocido y aceptado, en vez de un placebo se le denomina control activo.

IgA: Clase de inmunoglobulina que predomina en las secreciones.

IgA secretoria: Dímero de moléculas de IgA ligadas por la cadena J, y el componente secretorio.

IgG: Clase de inmunoglobulina predominante en el suero humano.

IgM: Inmunoglobulina pentamérica de elevado peso molecular.

Incidencia: Número de casos nuevos de una enfermedad determinada (o de un efecto adverso o de una complicación, etc.) que se desarrollan en una población de riesgo durante un período de tiempo.

Inmunidad mediada por células: Aquella en la que la participación de linfocitos y macrófagos es predominante.

Inmunodeficiencias: Grupo heterogéneo de enfermedades, congénitas o adquiridas, en las que algún componente de los mecanismos de defensa del hospedero está ausente o es funcionalmente defectuoso.

Inmunoepidemiología: Es la disciplina integradora orientada a la vigilancia de las enfermedades e investiga la influencia de la inmunidad poblacional sobre diferentes patrones epidemiológicos.

Inmunógeno: Sustancia que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria, en contraste con aquellas que sólo se combinan con los efectores (antígeno).

Inmunógeno T-dependiente: Inmunógeno que para generar anticuerpos necesita la cooperación de los linfocitos T.

Inmunogenicidad: Capacidad de un inmunógeno (vacunal o no) para inducir una respuesta inmune.

Inmunoglobulina: Glucoproteína compuesta de cadenas pesadas y ligeras. Todos los anticuerpos son inmunoglobulinas.

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

Linealidad: Es la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado.

Linfocito: Célula mononuclear, de núcleo con cromatina densamente empaquetada y un pequeño borde de citoplasma.

Linfocitos activados: Aquellos que han sido estimulados por algún inmunógeno.

Macrófagos: Fagocitos mononucleares que derivan de los monocitos y desempeñan papeles accesorios en la inmunidad.

Oponina: Sustancia capaz de intensificar la fagocitosis. Los anticuerpos y derivados del complemento son las principales.

Precisión: Se define como la dispersión de los datos obtenidos para una muestra procesada varias veces y se expresa como el coeficiente de variación.

Rango: Es el intervalo entre el mayor y el menor nivel de analito que pueden ser medidos con aceptable precisión y exactitud.

Reacción adversa: Un evento adverso que se considere **causalmente relacionado** con el, o los productos de investigación. Esta definición incluye las lesiones causadas por sobredosificación e interacciones con otros medicamentos.

Reactogenicidad: Incidencia y características de los eventos adversos locales o sistémicos que han ocurrido en relación con la administración de una vacuna.

Relación costo/beneficio: Expresión resultante de la consideración combinada de los beneficios y las pérdidas económicas asociados a una intervención médica.

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.

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.

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

Seroconversión: Aumento significativo de los títulos de anticuerpos inducidos por una vacuna con respecto a los detectados antes de la inmunización y que ofrece información sobre la inmunogenicidad de una vacuna.

Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos

Seroprotección: Título de anticuerpos que se supone corresponde a la protección clínica. No todas las vacunas lo tienen.

Subclase de inmunoglobulinas: Subdivisión de las clases de inmunoglobulinas, basadas en las diferencias estructurales y antigénicas en las cadenas pesadas.

Tolerancia (fortaleza): Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones de operación.

Vacuna: Preparado biológico que se inyecta en un organismo con el fin de lograr un estado de inmunidad contra un determinado agente infeccioso o una enfermedad dada.

Vacuna combinada: Contiene inmunógenos de varios agentes infecciosos diferentes (p. ej. La triple viral, sarampión-rubéola-parotiditis), que se aplican en una sola administración. No debe confundirse con vacunaciones simultáneas.

Vacuna conjugada: Vacuna de polisacáridos al que se une (conjugada) un derivado proteico con objeto de aumentar su inmunogenicidad, de esta forma pasa de ser timoindependiente a timodependiente, lo que permite que desencadene una respuesta inmune secundaria y de memoria adecuada incluso en lactantes pequeños.

Vacuna recombinante: Vacuna de inmunógeno proteico obtenido mediante la inserción (recombinación genética) en un microorganismo (p. ej., una levadura) o en un cultivo celular de un fragmento apropiado, habitualmente un plásmido bacteriano, que contiene el gen o segmento de ADN que codifica el inmunógeno deseado.

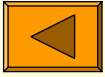
Validación: Es el proceso establecido para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos.

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.

Valor Predictivo Negativo: Es la probabilidad que tiene un individuo de ser negativo, cuando el resultado de la prueba es no reactivo.

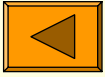
SECCIÓN I

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS

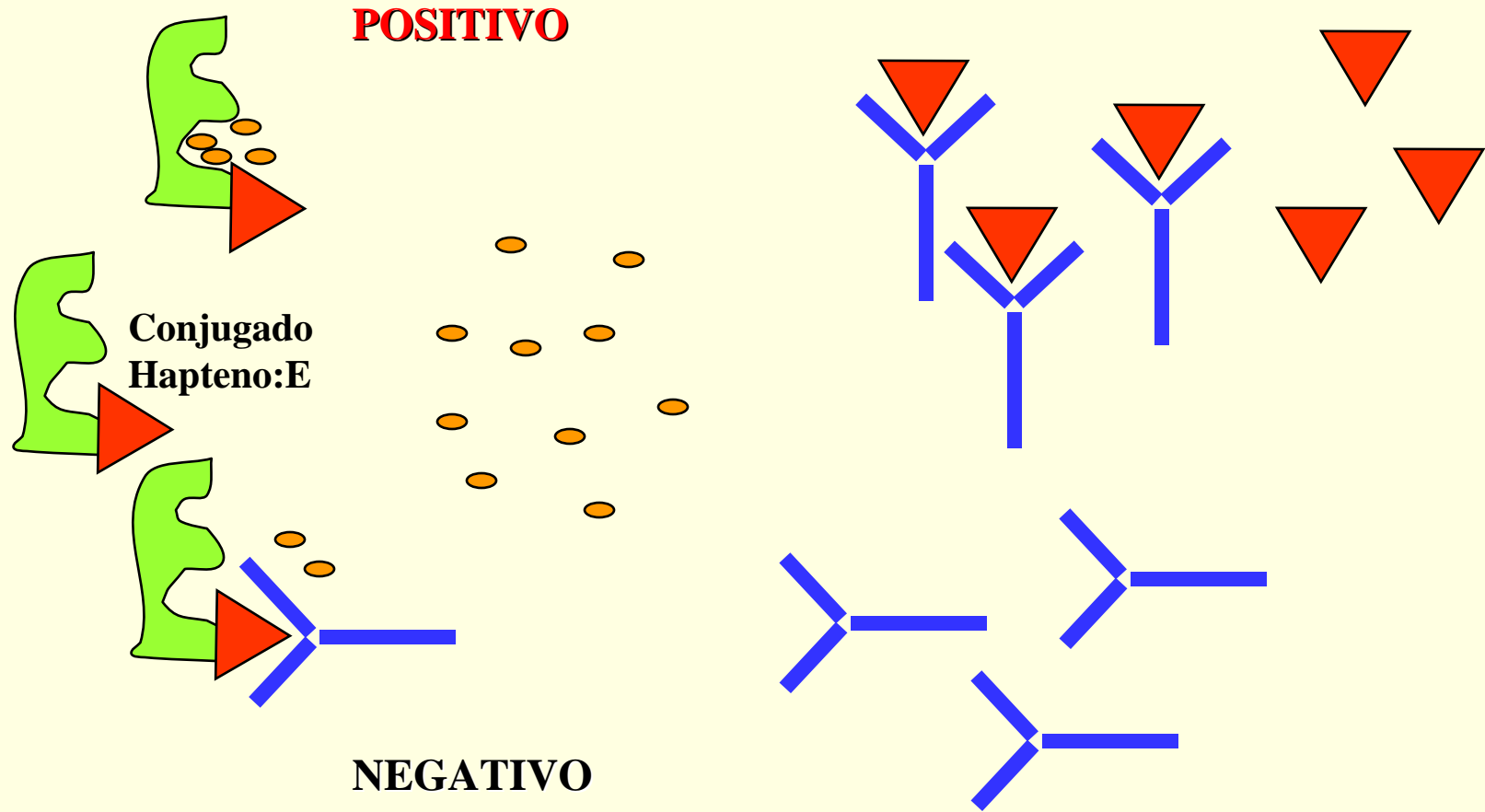


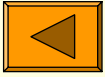
INMUNOENSAYOS CON MARCADORES

- **Inmunofluorescencia (IFA)**
- **Radioinmunoanálisis (RIA)**
- **Ensayos Inmunoradiométricos (IRMA)**
- **Ensayos inmunoenzimáticos (EIA)**
- **Hibridación con sondas de ácidos nucleicos**
- **Otros**

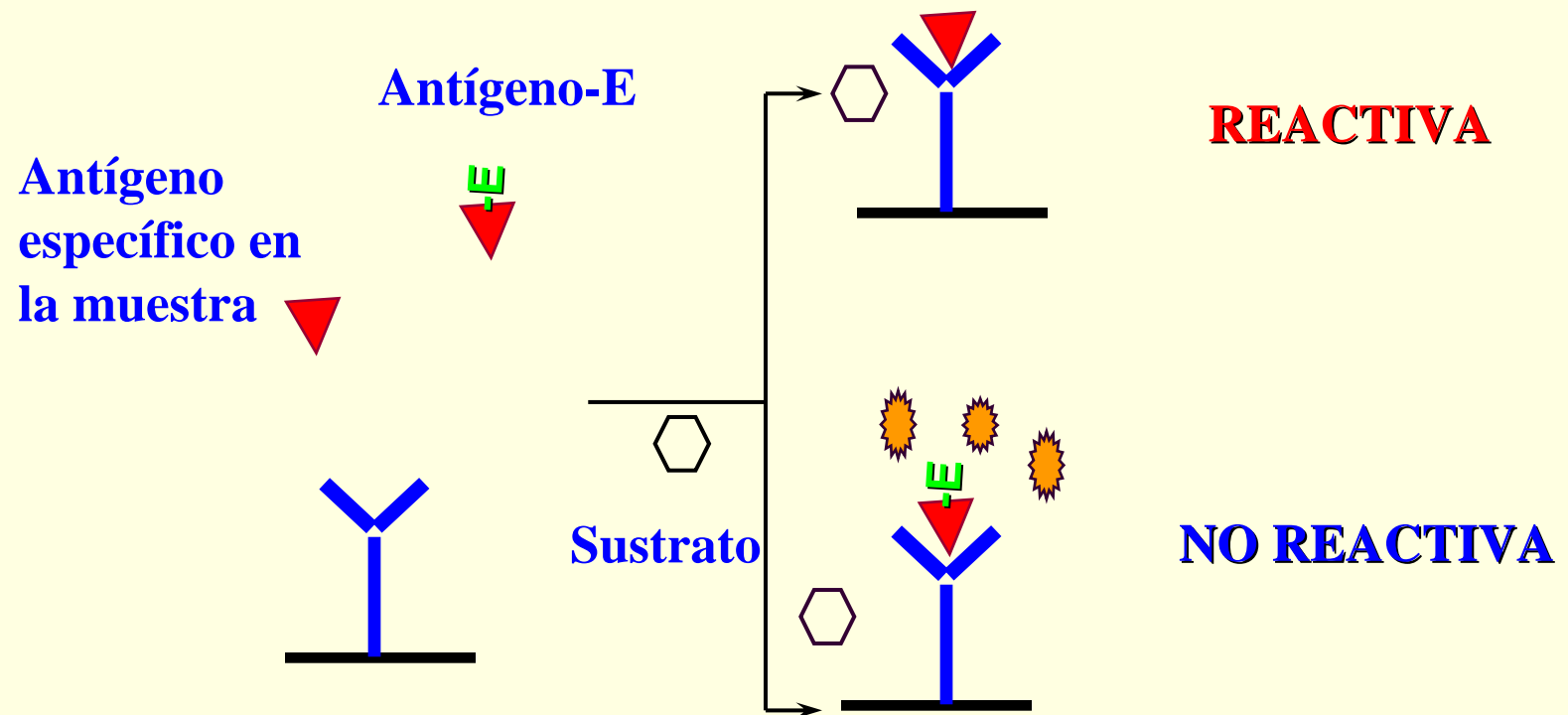


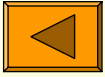
ENSAYO HOMOGÉNEO





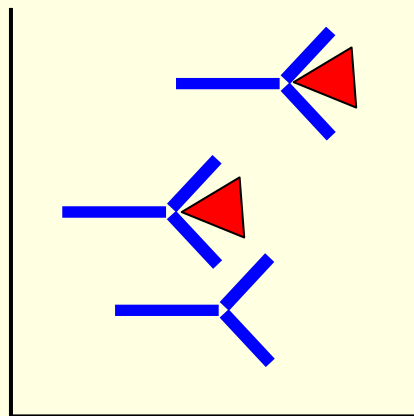
ENSAYO COMPETITIVO (ANTÍGENOS)



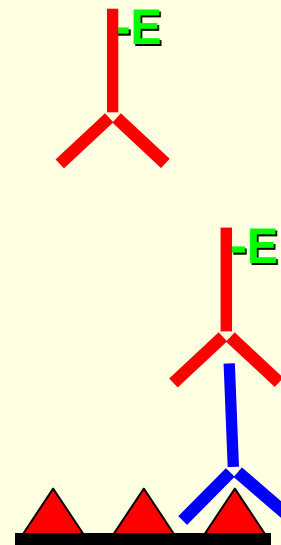
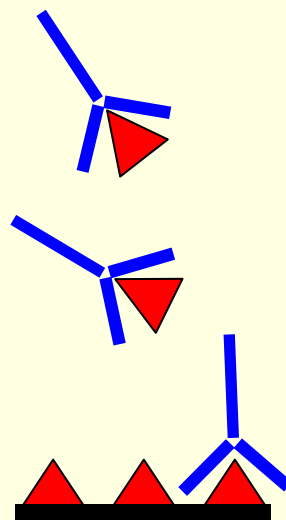


ENSAYO DE INHIBICIÓN

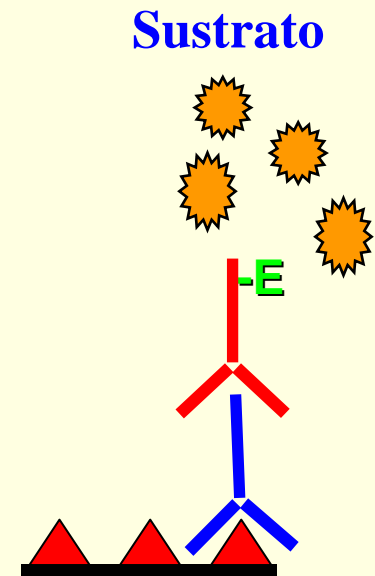
El antígeno en solución
reacciona con los
anticuerpos libres



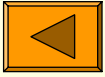
Antígeno de
recubrimiento



Conjugado
Anti-Ig:E

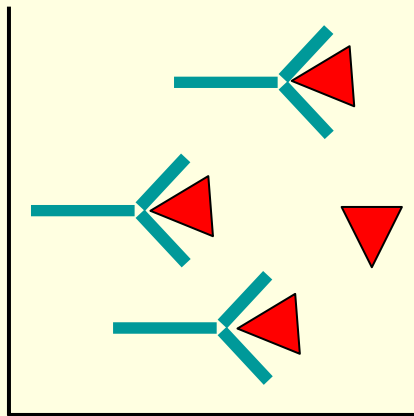


Sustrato

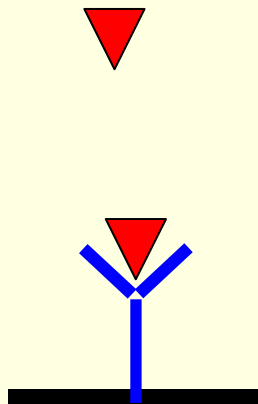


INHIBICIÓN DE ANTÍGENO

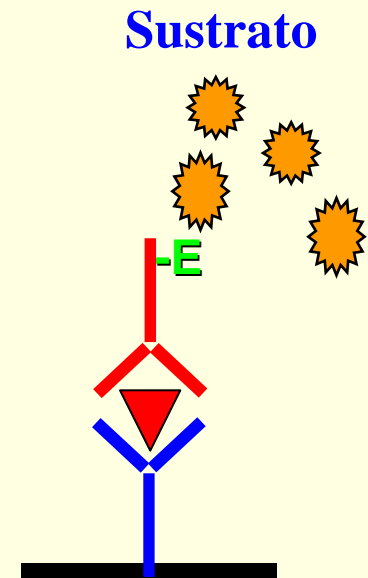
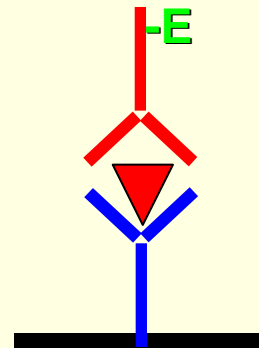
El antígeno en solución reacciona con los anticuerpos de la muestra

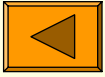


Anticuerpo de recubrimiento

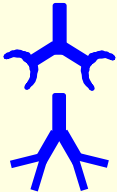
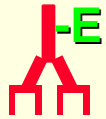


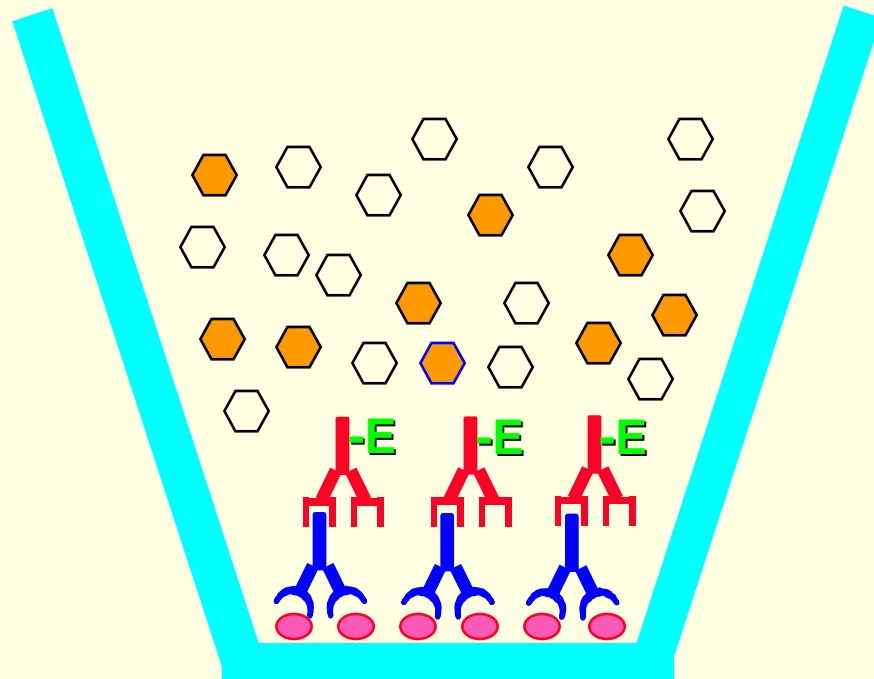
Conjugado

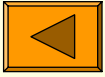




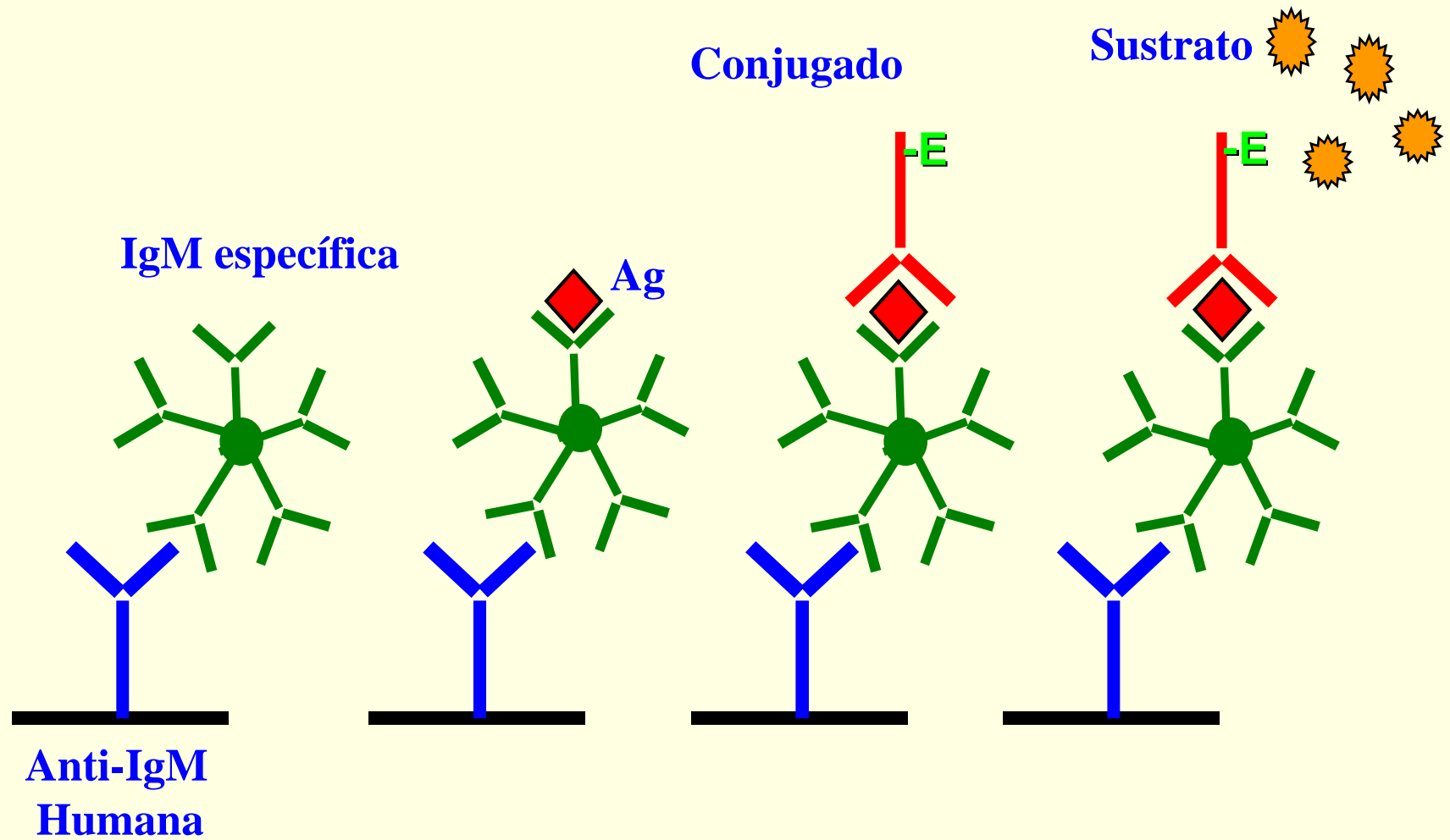
ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

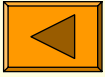
- Antígeno de recubrimiento
-  Anticuerpos en la muestra
-  Anti-Ig:E
- Sustrato
- Producto de la reacción enzimática



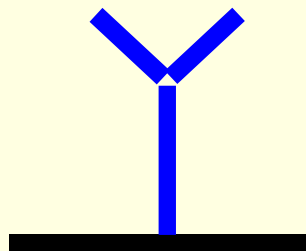


SÁNDWICH DE CAPTURA IGM

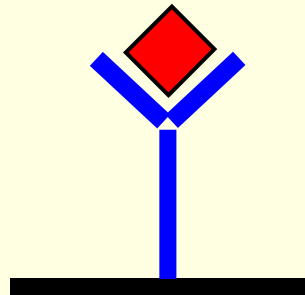




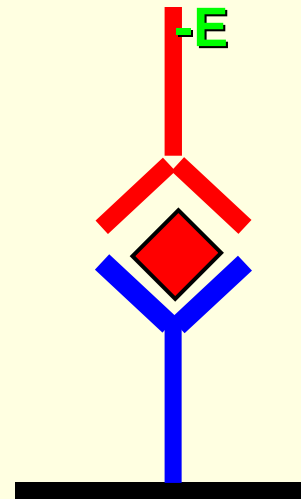
ENSAYO TIPO SÁNDWICH DOBLE ANTICUERPO



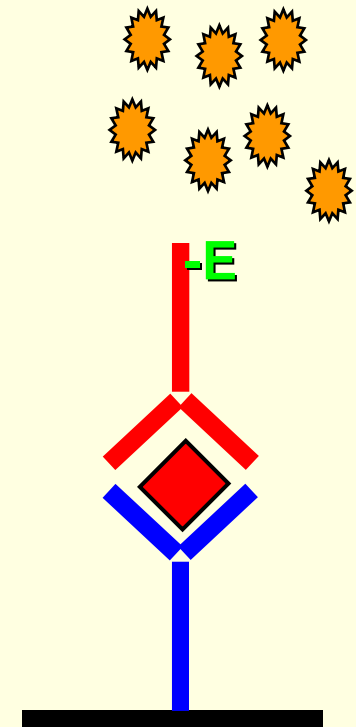
Anticuerpos
de captura



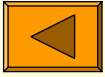
Muestra





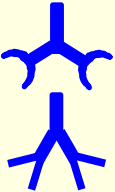



Conjugado

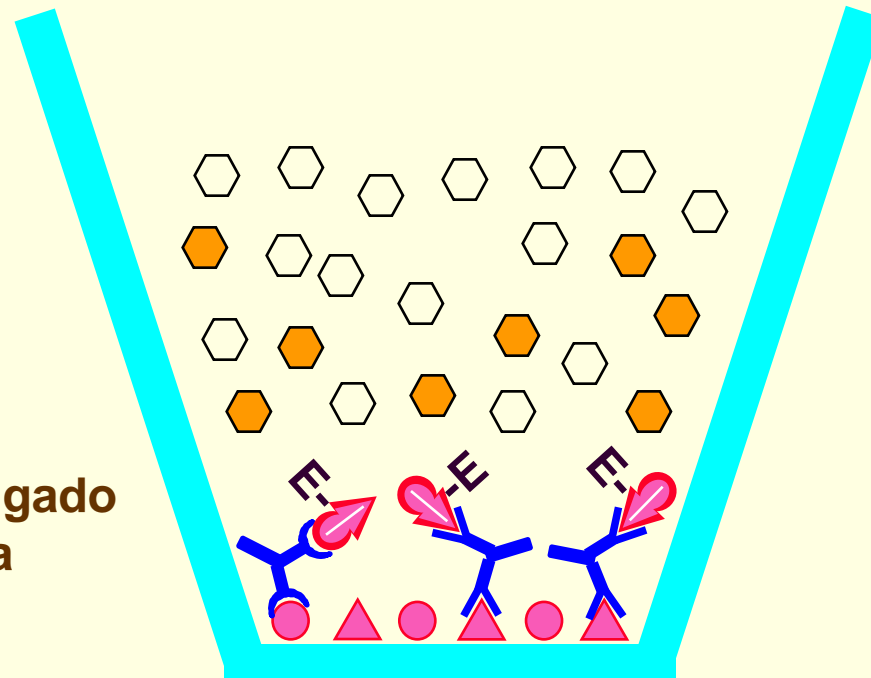


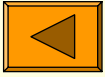
Sustrato



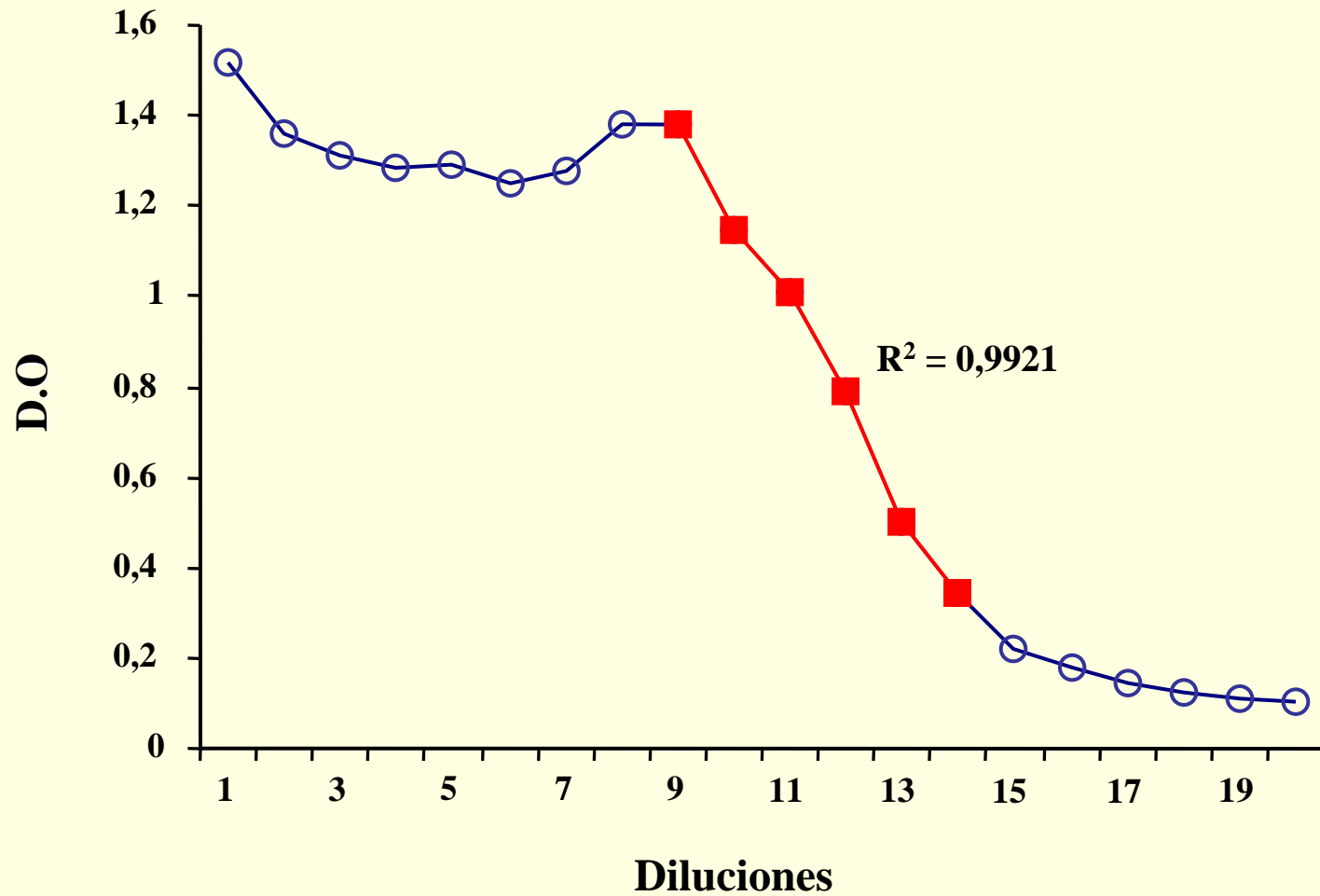
ELISA DE DOBLE ANTÍGENO

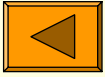
-  Antígeno de recubrimiento
- 
-  Anticuerpos en la muestra
-  -E Antígeno conjugado con una enzima
-  Sustrato
-  Producto de la reacción enzimática





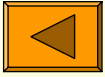
Determinación del rango de la curva de calibración



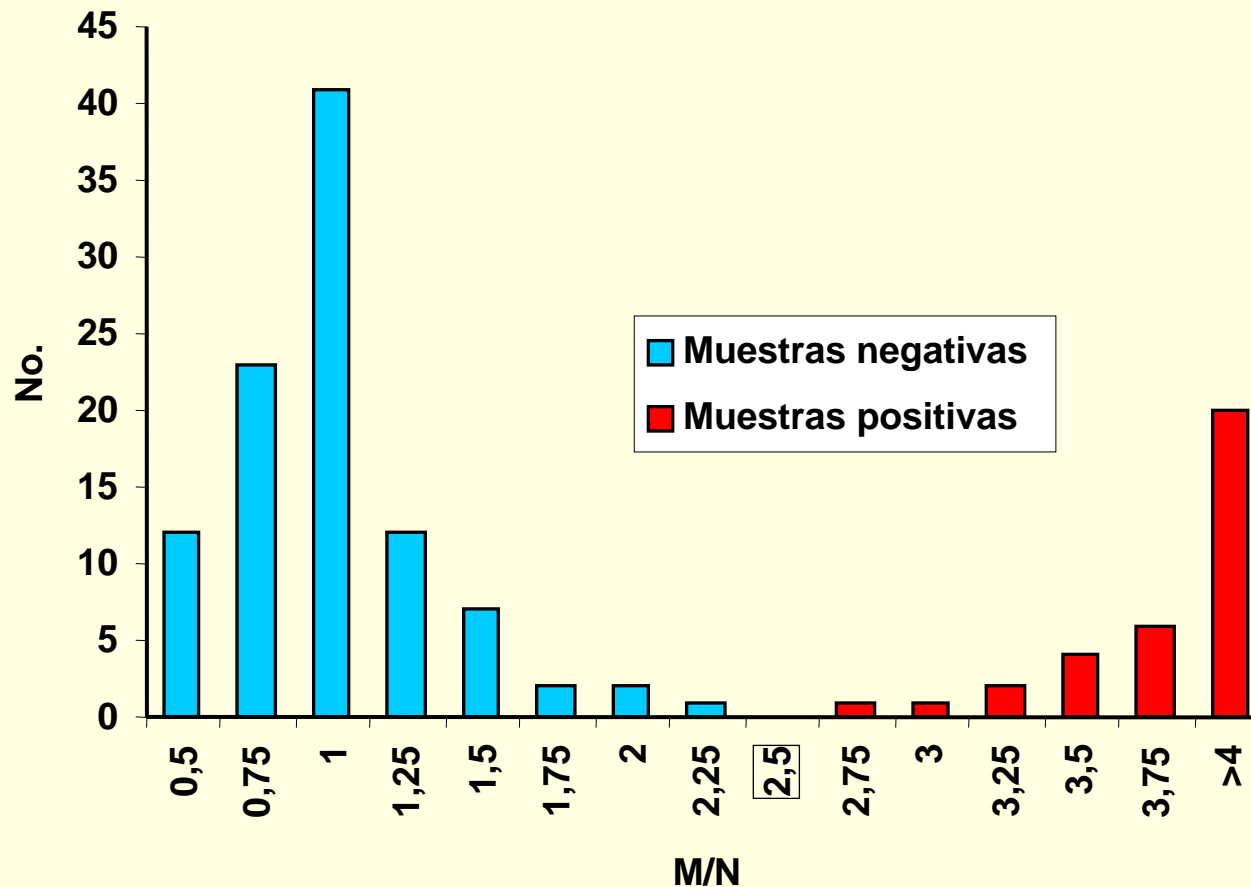


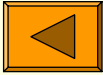
Sueros estándares y controles

- **Preparación del material:** Preferentemente debe usarse suero, el que debe ser clarificado, centrifugado, filtrado por 0,2 micras y preservado, ej; con azida sódica o tiomersal.
- **Ajuste concentración:** Utilizando estándares primarios o secundarios. En caso extremo pueden asignárseles unidades arbitrarias, preferentemente con respecto a otra prueba.
- **Características generales:** Deben tener igual o similar composición que las muestras.



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)



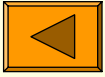


Poliestireno de elección según su preferencia para la adsorción de biomoléculas

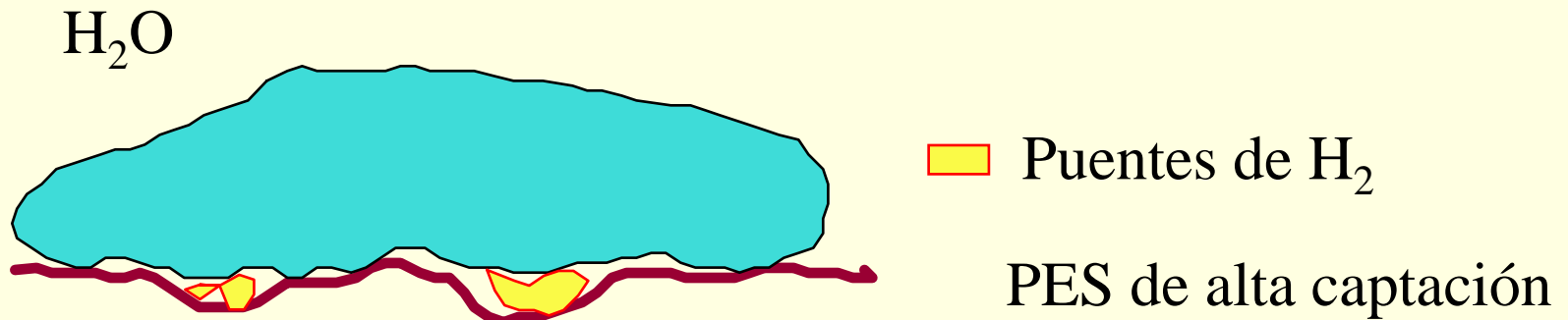
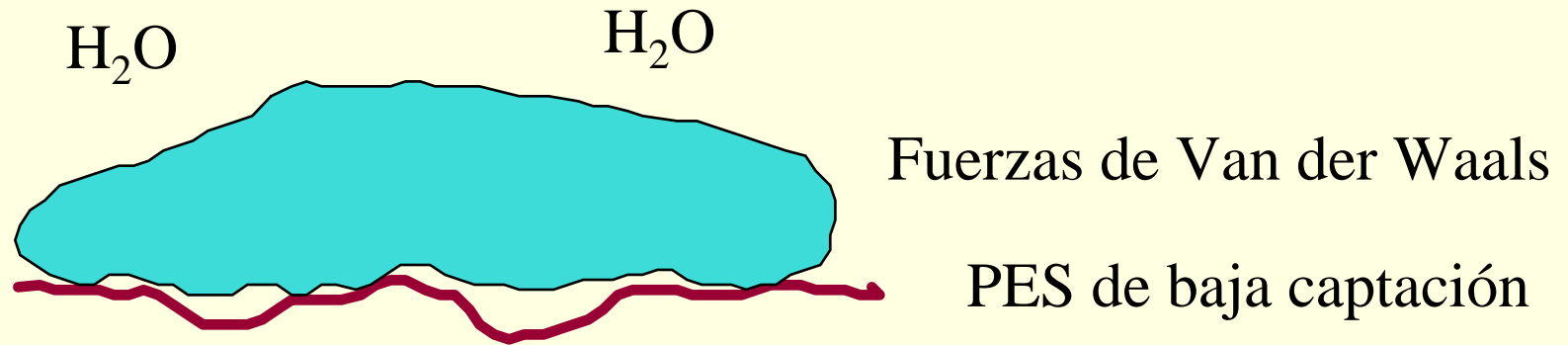
Alta captación	Estándar
Proteínas y péptidos *	Proteínas y péptidos **
Glicoproteínas	Lipoproteínas
Poliglicanos	Lípidos

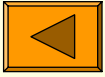
* Predominio de aminoácidos hidrofílicos.

** Predominio de aminoácidos hidrofóbicos.



Adsorción de biomoléculas a PES



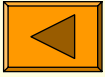


Metodología para determinar la concentración óptima de recubrimiento

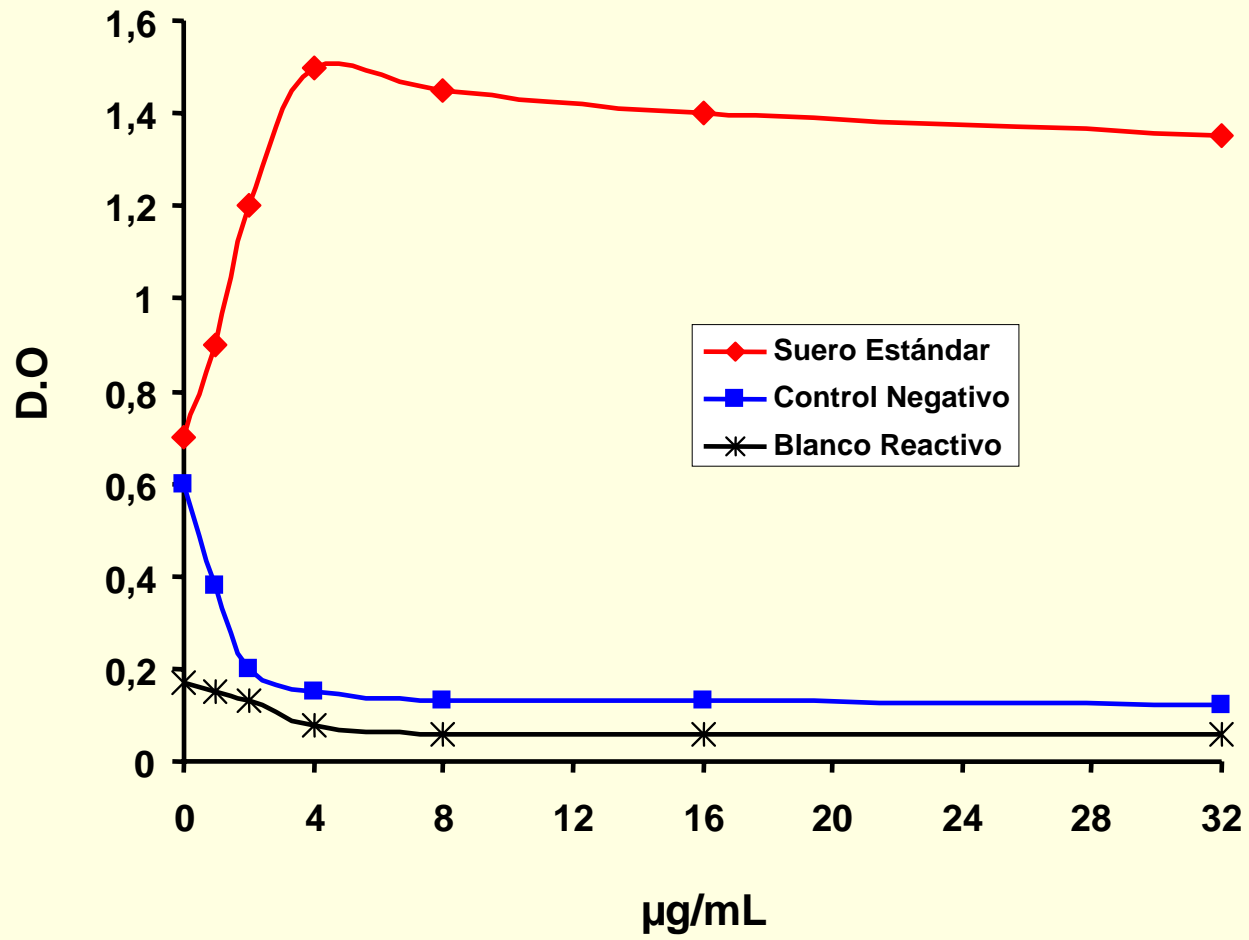
Estará en dependencia del tipo de ensayo, en los competitivos la concentración será la mínima tolerada. En los restantes ensayos deberá trabajarse en concentraciones correspondientes a la “meseta”

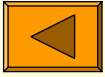
Se define como “**meseta**” aquellas concentraciones de recubrimiento correspondientes a la máxima señal para una concentración dada del analito.

Efecto “**Hook**” (gancho) es el fenómeno que aparece a elevadas concentraciones de recubrimiento y que se traduce por disminución de la señal con respecto a concentraciones precedentes del analito.



Determinación de las condiciones óptimas de recubrimiento





Muestras

Puede usarse cualquier líquido corporal, sangre o suero secado sobre papel de filtro. Habitualmente el suero es el material de elección.

Las muestras pueden analizarse puras o en bajas diluciones (ensayos tipo sándwich) o en diluciones varias, sobre todo en los ensayos indirectos. La dilución estará en dependencia de las pretensiones del ensayo, el comportamiento del material de captura y del conjugado.

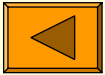
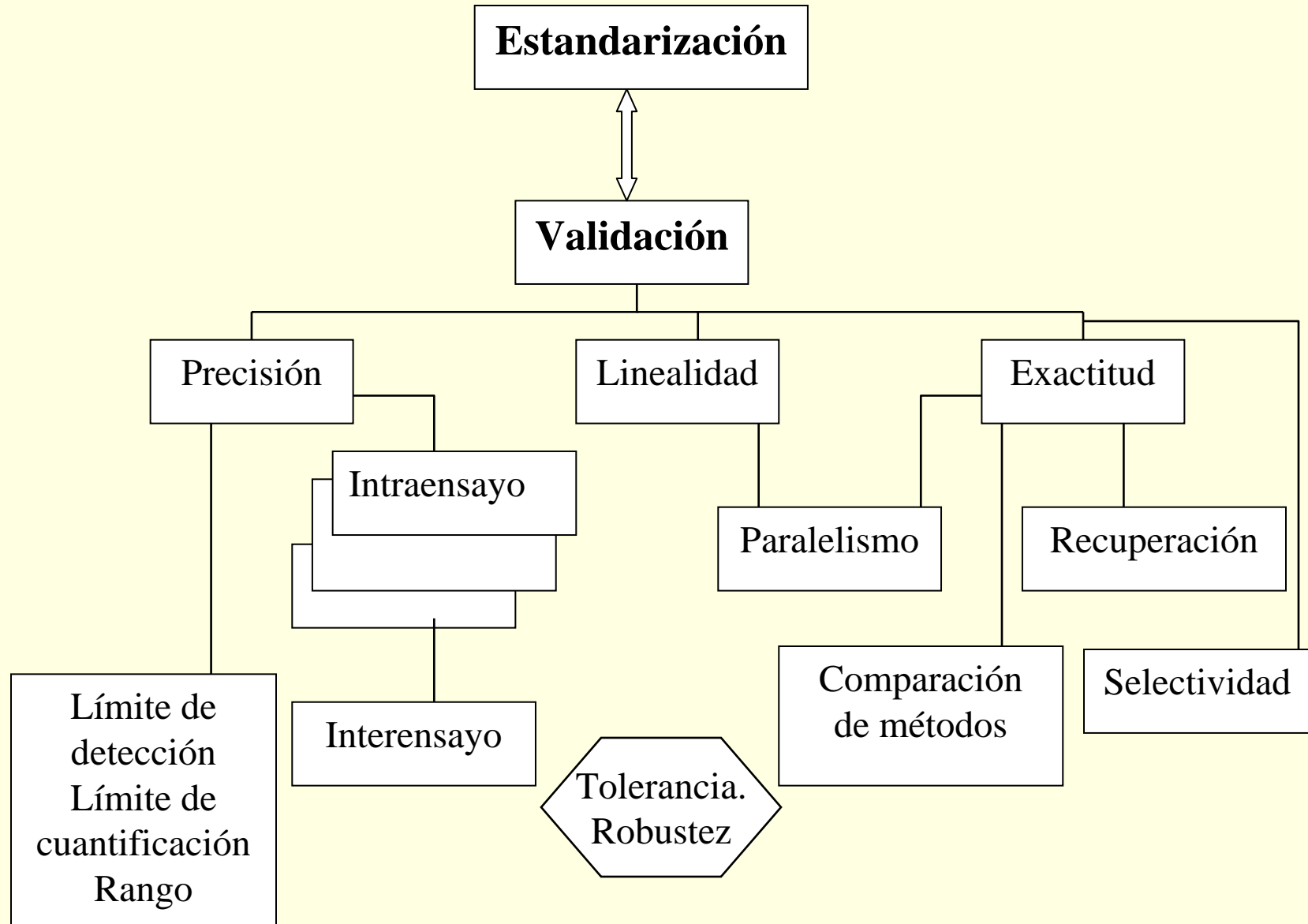
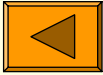


Diagrama de flujo para la validación de ensayos cuantitativos





Exactitud medida por un ensayo de recuperación

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

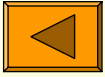
Muestras sin diluir = La concentración calculada en la muestra.

Valor esperado = La concentración teórica o real. En este ejemplo:

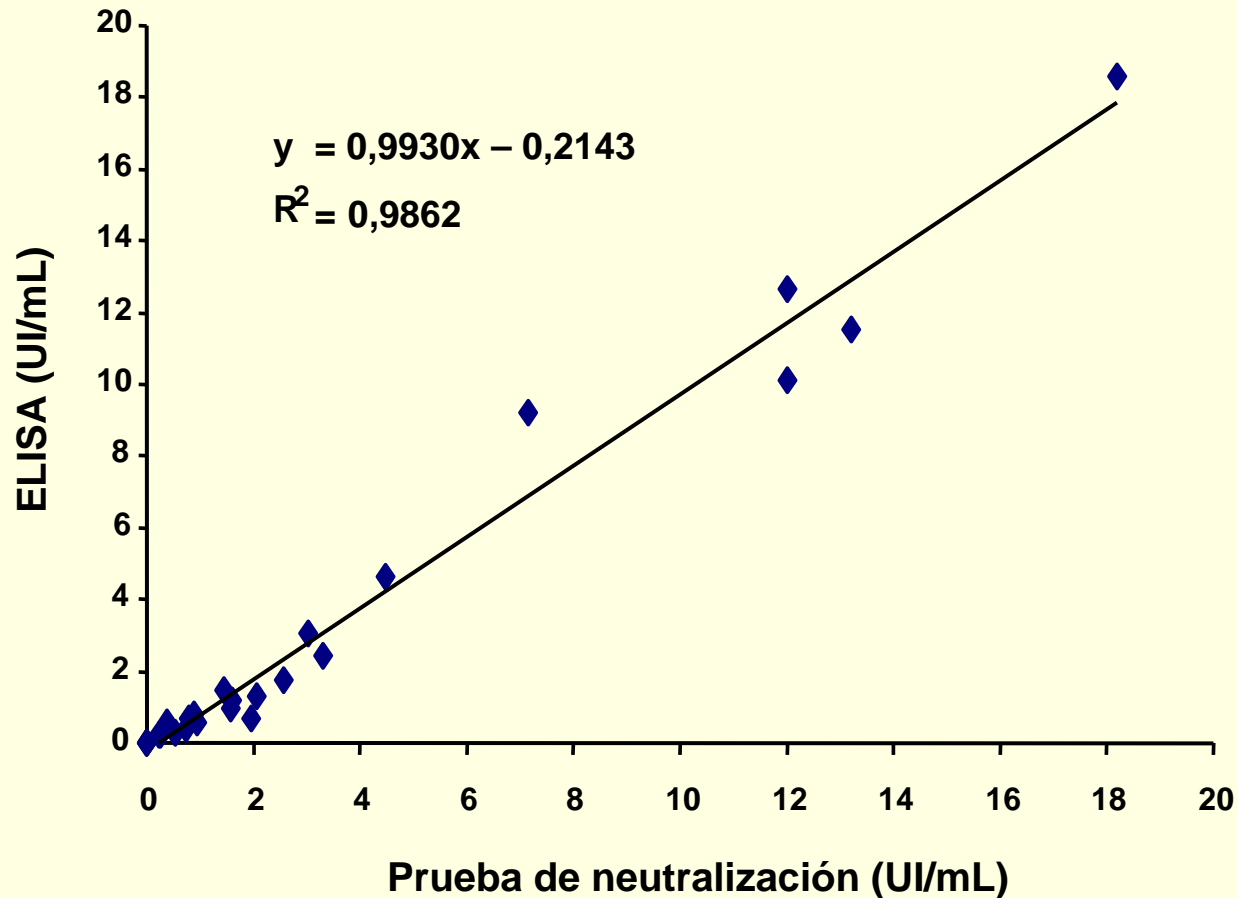
$$\text{Muestras sin diluir} / 2$$

Valor obtenido = Es la concentración calculada en el ensayo.

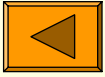
$$\text{RECUPERACIÓN} = (\text{Valor obtenido} \times 100) / \text{Valor esperado}$$



Análisis de regresión lineal entre los valores de actividad de antitoxina tetánica obtenidos por ELISA y una prueba de neutralización *in vivo* empleada como referencia

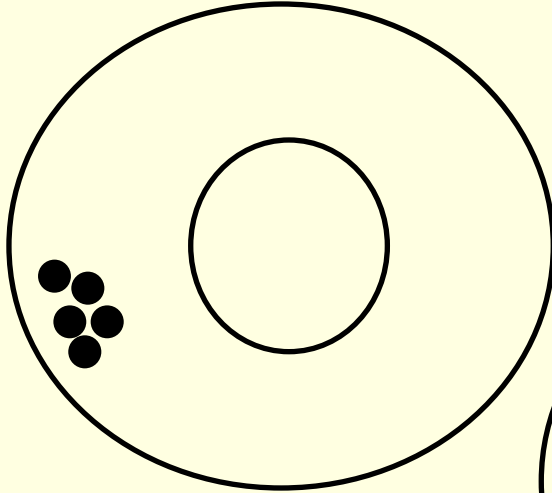


Ochoa R, Martínez JC, Fajardo EM, Alvarez E, Estrada E, García AM, et al. Validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano. *VacciMonitor* 2000;9(4):16-21.

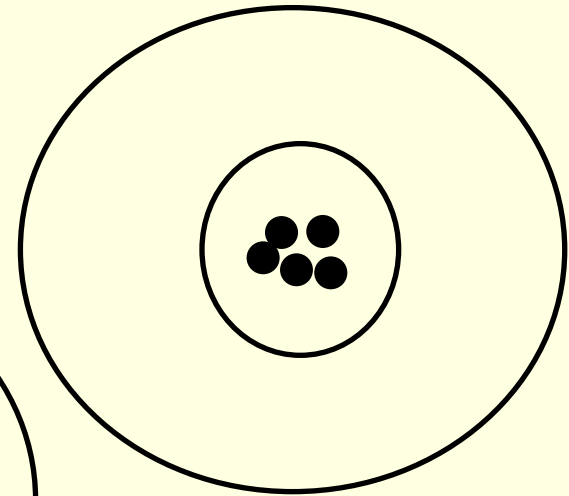


Modelo “tiro al blanco” para ejemplificar la precisión y exactitud de un ensayo

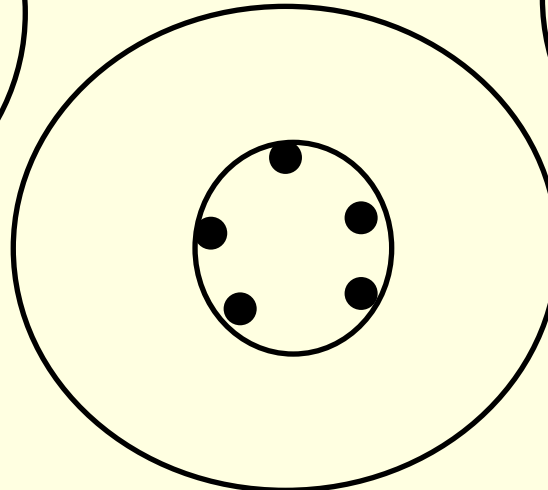
**BUENA PRECISIÓN –
MALA EXACTITUD**

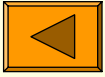


**BUENA PRECISIÓN Y
BUENA EXACTITUD**

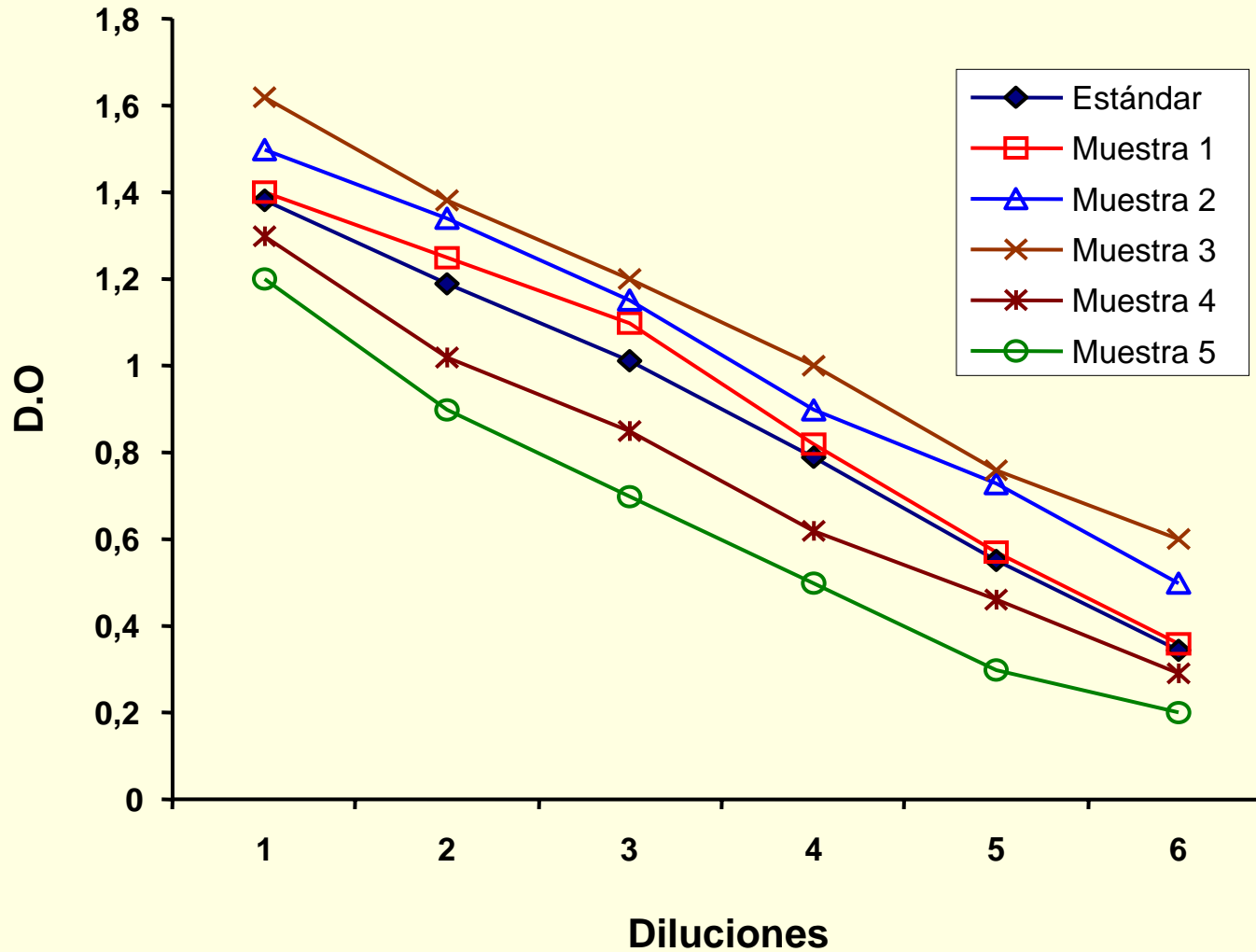


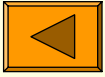
**BUENA EXACTITUD –
MALA PRECISIÓN**





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





Límite de detección

Es la Concentración mínima detectable.

Pendiente Positiva: Blanco + 2 ó 3 DE

Pendiente Negativa: Blanco – 2 ó 3 DE

$LD = 3 \text{ DE Blanco} / (\text{DE muestra}/\text{conc muestra})$

$LD = 3 \text{ DE Blanco} / \text{pendiente recta calibración}$

$LD = 95 \text{ percentil de las mediciones} + 1,65 \text{ DE}$

(se sugiere realizar al menos 60 mediciones de varias muestras de bajos títulos)

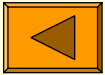
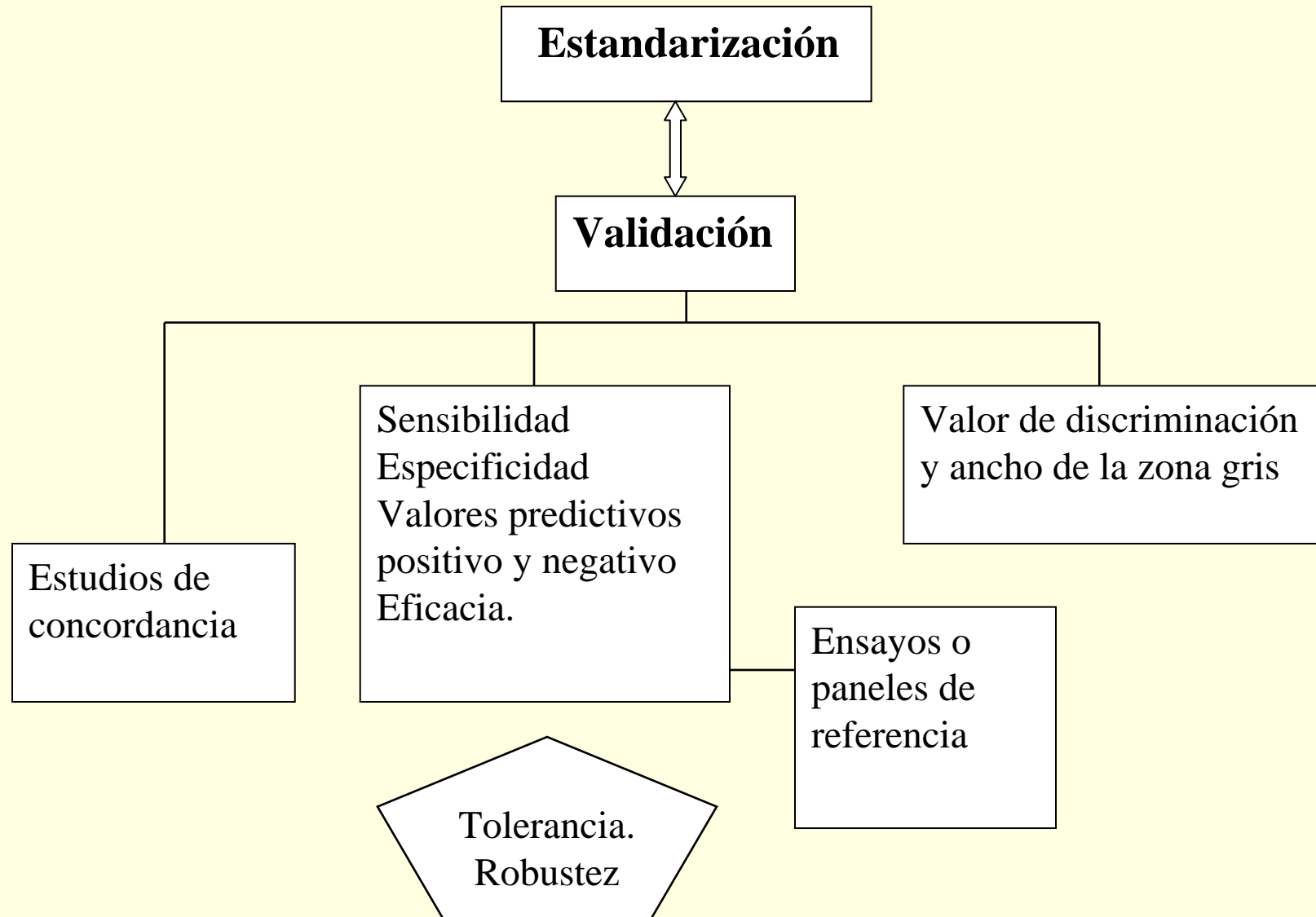
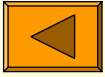


Diagrama de flujo para la validación de ensayos cualitativos





Método de cálculo utilizando tablas de contingencia

Ensayo evaluado	Referencia		Total
	Resultados Positivos	Resultados Negativos	
Resultados Positivos	A	B	A+B
Resultados Negativos	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

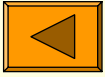
$$\text{Sensibilidad} = [A / (A+C)] \times 100$$

$$\text{Especificidad} = [D / (B+D)] \times 100$$

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

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

$$\text{Eficacia} = [(A+D) / (A+B+C+D)] \times 100$$



Índice Kappa. Procedimiento de cálculo

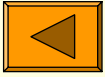
Ensayo evaluado	Referencia		Total
	Resultados Positivos	Resultados Negativos	
Resultados Positivos	A	B	A+B
Resultados Negativos	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	n=A+B+C+D

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

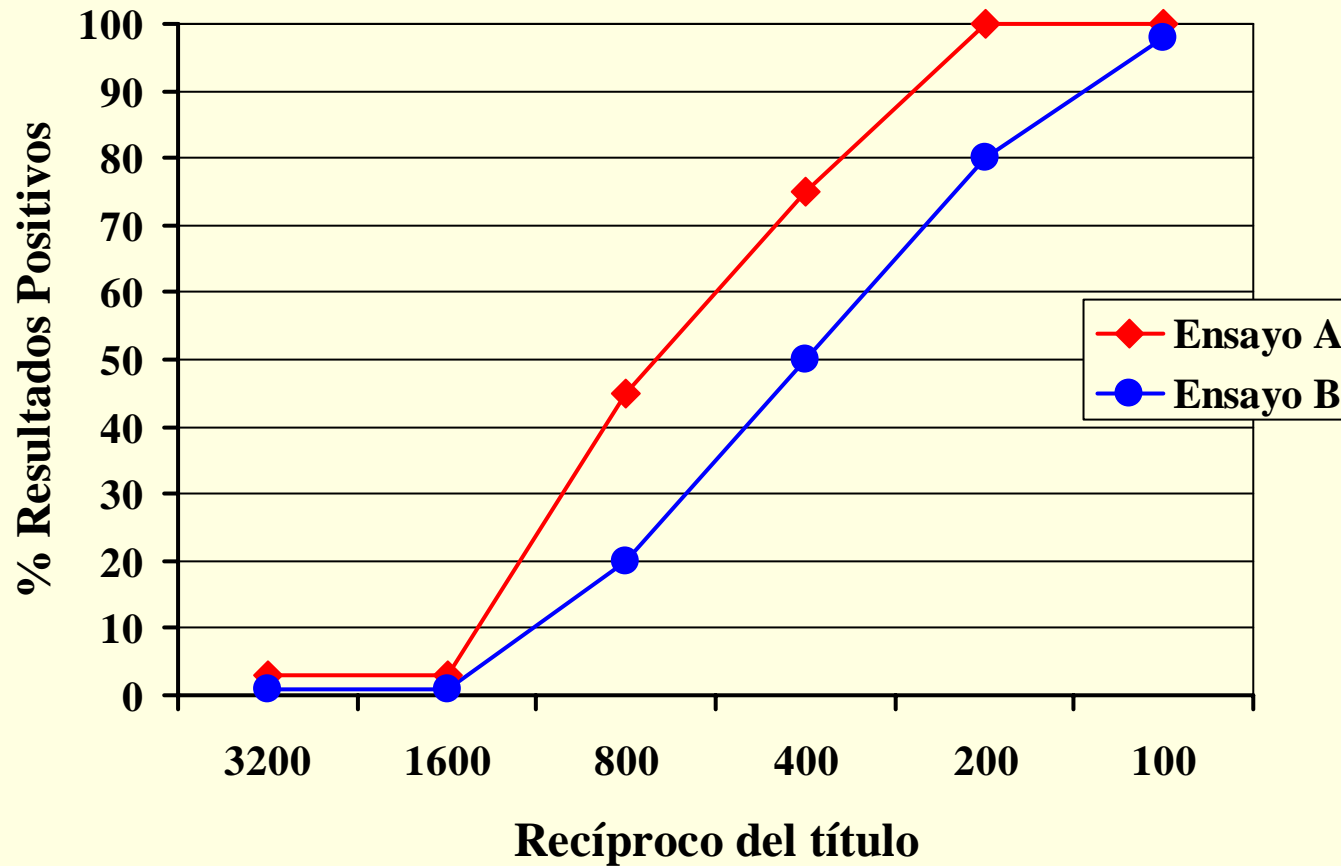
Donde: $p_o = (A+D)/n$; $p_e = (P+N)/n$

Concordancia en el caso de positivos $P = [\{(A+B)/n\} \times \{(A+C)/n\}] \times n$

Concordancia en el caso de negativos $N = (C+D) - \{(A+C) - P\}$

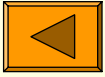


Ancho de la zona gris (entre el 5 % y el 95 %) y el valor de discriminación (50 %)



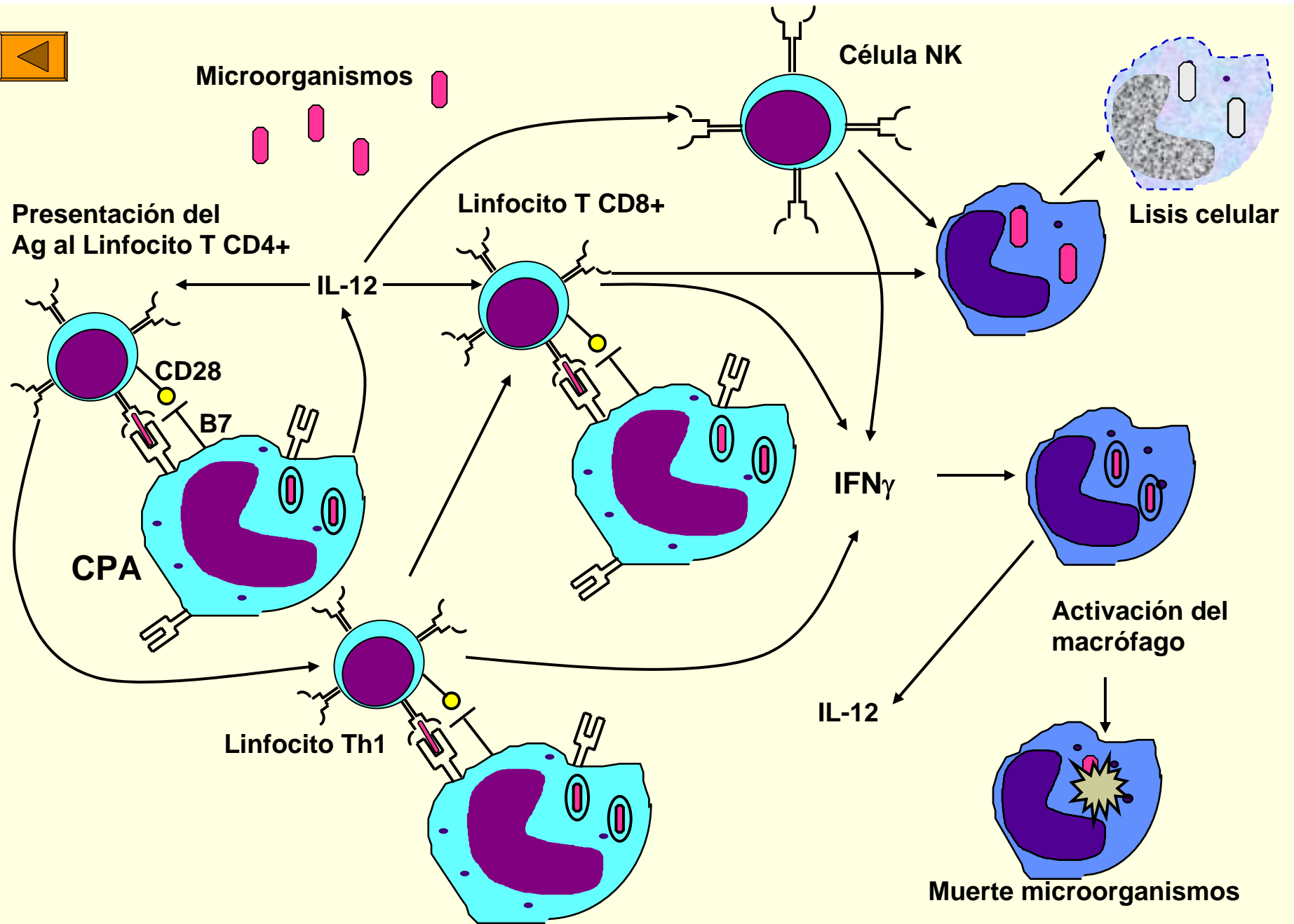
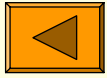
SECCIÓN II

**ENSAYOS CLÍNICOS DE VACUNAS Y
ESTUDIOS INMUNOEPIDEMIOLÓGICOS**

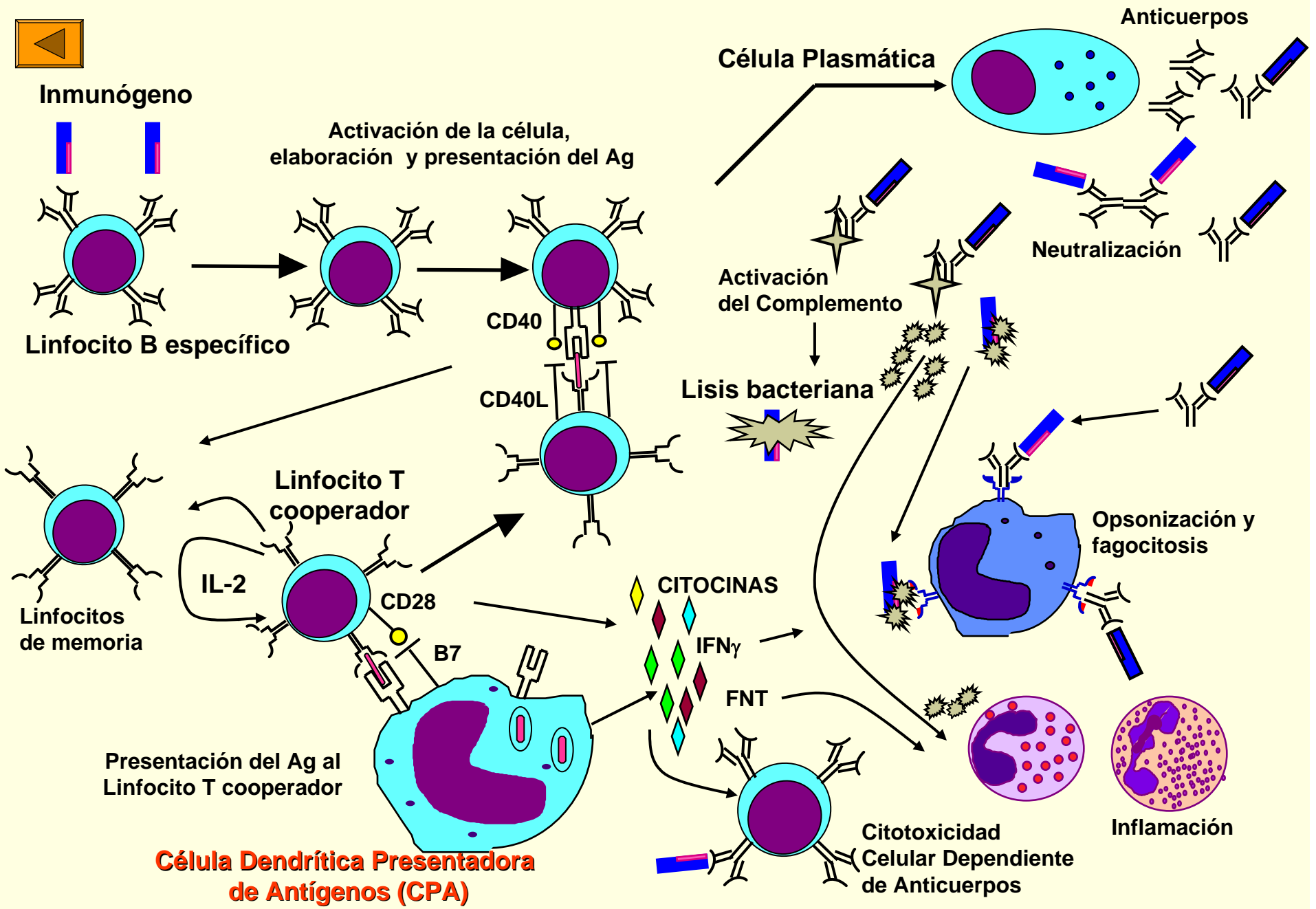
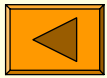


Impacto sobre la Economía

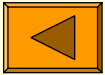




Inmunidad contra microorganismos intracelulares

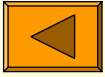


Respuesta inmune humoral timodependiente



Principales diferencias inmunológicas entre vacunas de polisacáridos

	NO conjugadas (T-independientes)	Conjugadas (T-dependientes)
Memoria	NO	SI
Intensidad	Menor	Mayor
Duración	Menor	Mayor
Isotipo de Acs	IgM - IgG (IgG2)	IgG (IgG1, IgG3)
Afinidad de Acs	Menor	Mayor
Inmunidad comunitaria	No	Si
Hiporrespuesta	Posible	No
Aplicación a partir de:	> 2 años	< 2 años



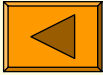
Características diferenciales de las vacunas vivas e inactivadas

Vacunas vivas

- * Atenuadas
- * Una dosis, protección de larga duración
- * Se replican en el huésped
- * Menos estables
- * No requieren adyuvantes
- * Pueden administrarse por vía natural
- * Inducen Acs y respuestas Tc
- * Posible difusión de la infección entre no vacunados

Vacunas inactivadas

- * Pueden elaborarse a partir de microorganismos virulentos
- * Dosis múltiple, protección más corta
- * Requieren adyuvantes generalmente
- * Por lo general se administran por vía parenteral
- * Inducen Acs
- * No es posible la difusión de la infección a los no vacunados



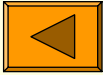
Características de las vacunas comercializadas

	<i>m.o. vivos atenuados</i>	<i>Inactivados</i>	<i>Proteínas Rec.</i>
<i>Refuerzo</i>	No gralmente	Si	Si
<i>Estabilidad</i>	Baja	Estable	Estable
<i>R.Inmune</i>	Humoral y Celular	Humoral	Humoral
<i>Reversión</i>	Posible	No	No
<i>Adyuvantes</i>	No	Si	Si



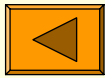
Características de las vacunas en fase de investigación

	<i>Péptidos sintéticos</i>	<i>Vectores vivos</i>	<i>Vacunas de ADN</i>
<i>Refuerzo</i>	Si	Posiblemente	Posiblemente
<i>Estabilidad</i>	Estable	Baja	Muy Estable
<i>R.Inmune</i>	Humoral	Humoral y Celular	Humoral y Celular
<i>Reversión</i>	No	Posible	No
<i>Adyuvantes</i>	Si	No	No

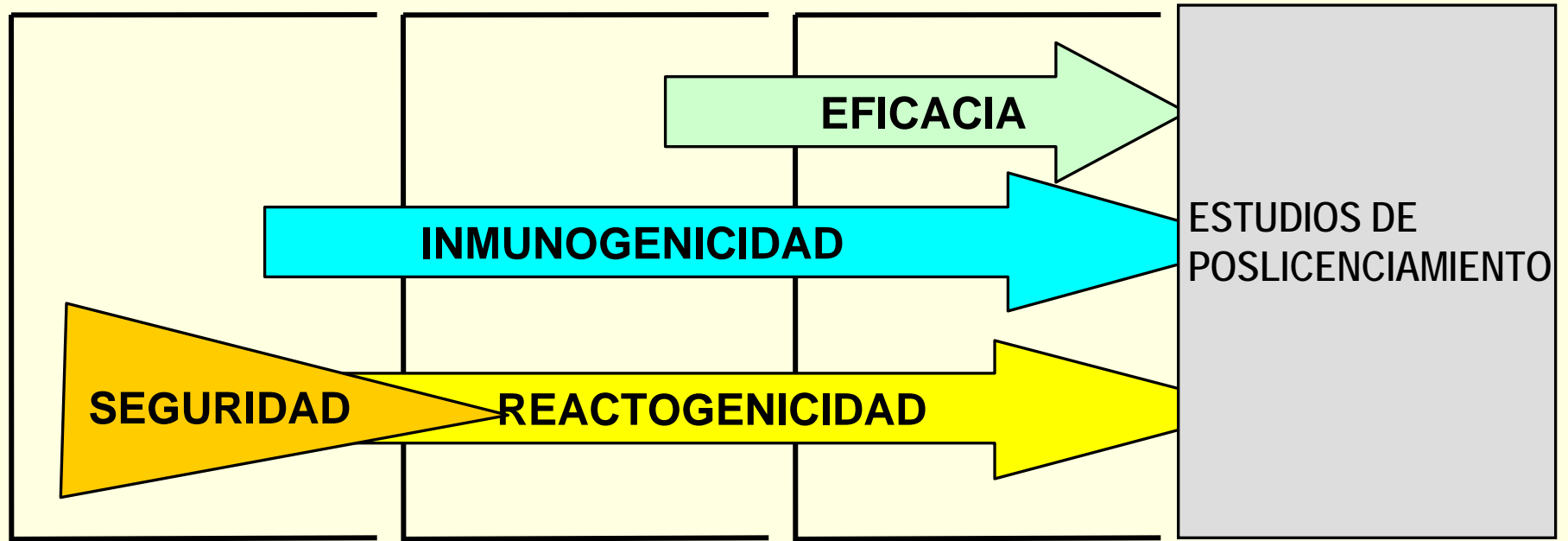


Vacunas en el siglo XXI

Embarazo	dT, Gripe, Estreptococos del grupo β , VRS, <i>pertussis</i> acelular, neumococo, parainfluenza
Neonatal	TB, VSR/parainfluenza, hepatitis B
2-6 meses	Combinaciones pediátricas (DTPa/IPV/Hep/Hib/Neumo/Meningo), rotavirus, VSR/parainfluenza
Subdesarrollados	<i>E coli</i> enterotoxigénica, <i>Shigella</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , f. tifoidea, malaria, dengue, TB
1-2 años	PRS-Varicela, gripe, refuerzos pediátricos
4-6 años	PRSV, <i>S. mutans</i> , enf de Lyme, TB
Adolescentes	ETS-VIH, herpes virus 2, VEB, CMV, papilomavirus, parvovirus, refuerzos
Adultos jóvenes	dTPa, <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , meningocócicas, vacunas del viajero, refuerzos
>55 años	Gripe, neumocócica, herpes zoster, cáncer, refuerzos



Clasificación de los Ensayos Clínicos



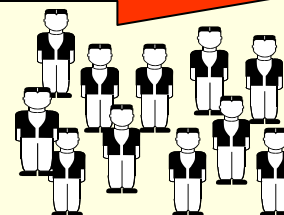
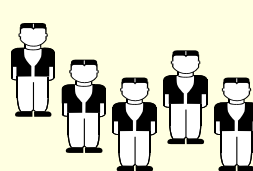
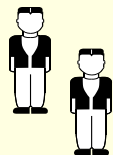
Seguridad y Reactogenicidad. Evaluación preliminar de la Inmunogenicidad

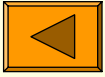
Reactogenicidad e Inmunogenicidad. Exploración preliminar de la Eficacia

Confirmación de la Eficacia con lotes fabriles. Reactogenicidad e Inmunogenicidad

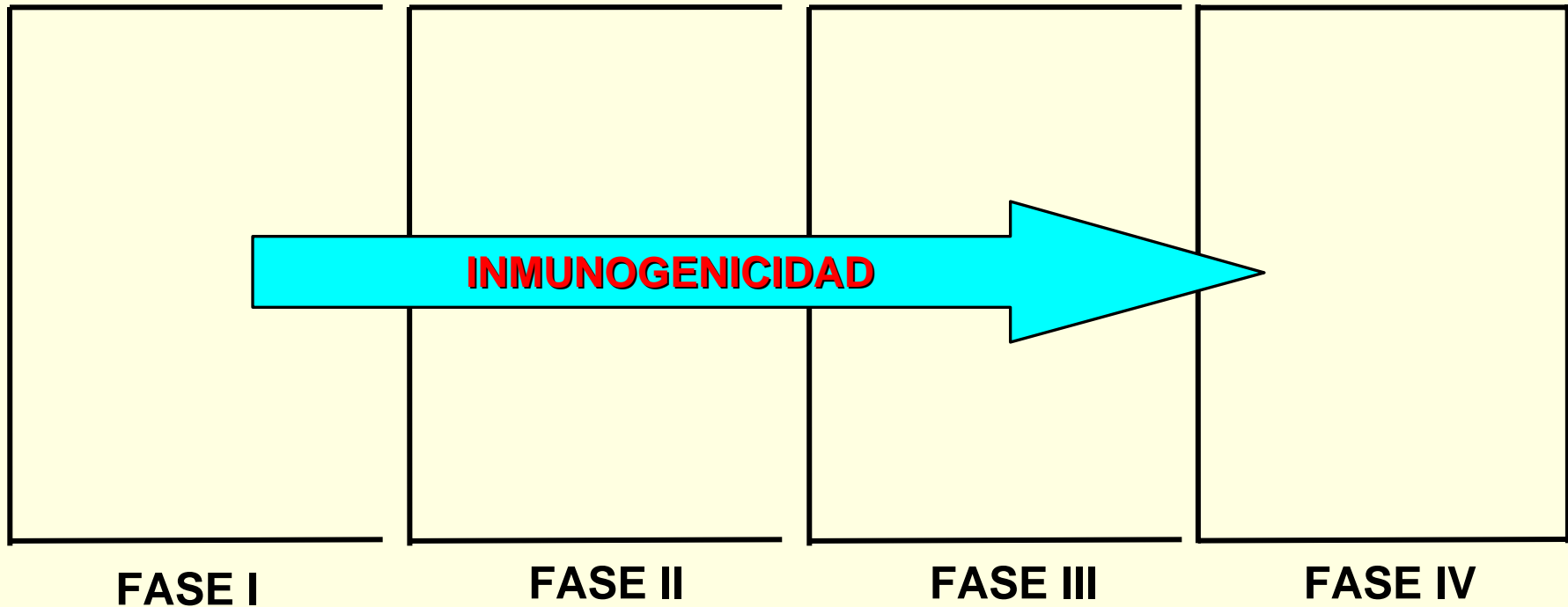
Vigilancia poscomercialización

Controlados, aleatorizados, a ciegas

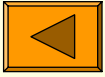




INMUNOGENICIDAD

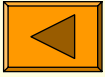


**Capacidad de una vacuna para inducir
inmunidad humoral o celular**



Mediciones del efecto protector

- **Basadas en la ocurrencia de casos de la enfermedad de interés u otra condición asociada al agente causal, por ejemplo, portador o infección subclínica**
- **Eficacia “inferida” a partir de una medición de Inmunogenicidad:**
 - **La proporción de sujetos vacunados que alcanzan un nivel de anticuerpos asociado a protección**



EFICACIA

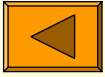
**EFFECTIVIDAD
o IMPACTO**

**Capacidad de la vacuna de estimular
una respuesta inmune que resulte protectora**

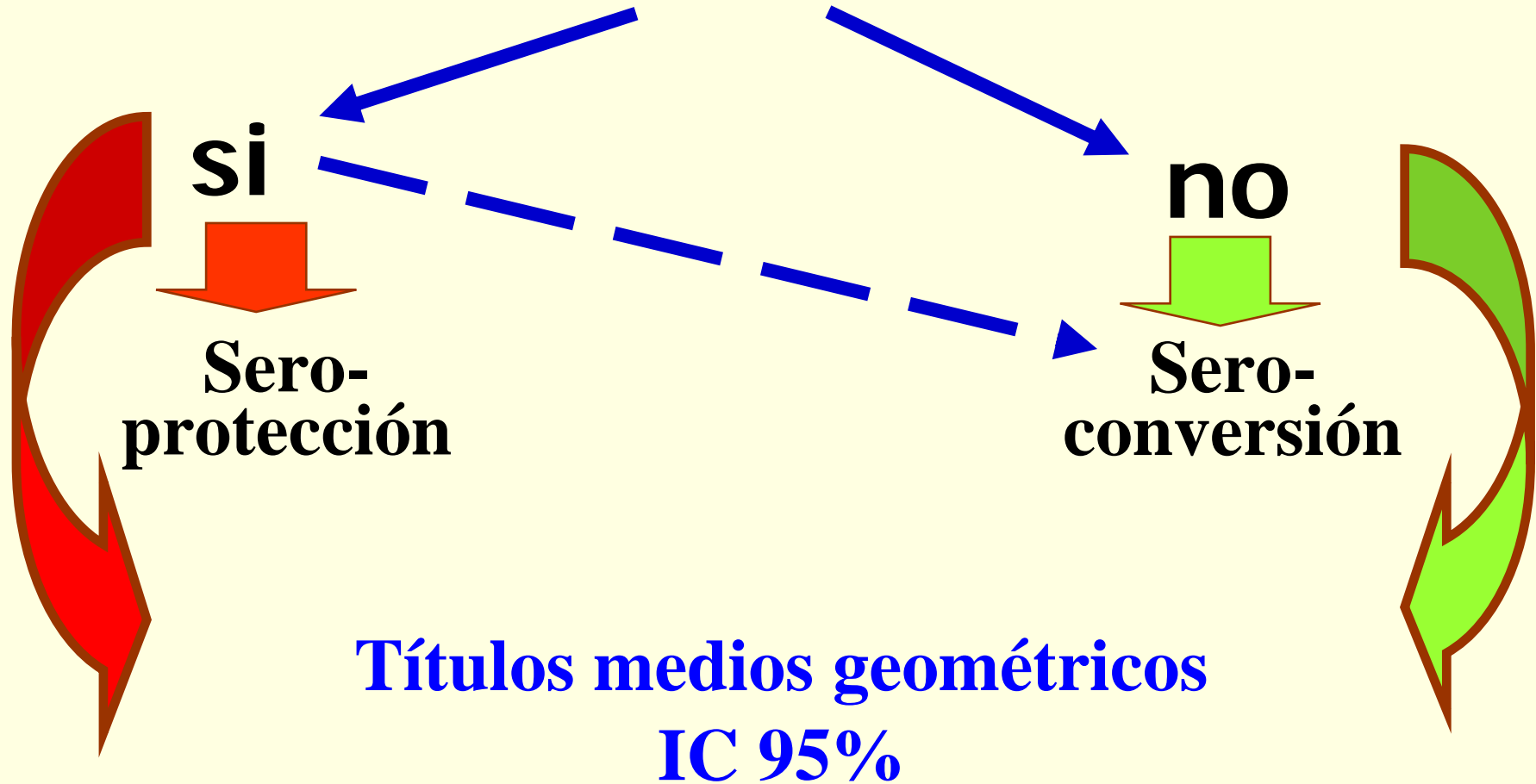
En condiciones ideales

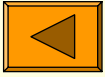
**En la práctica clínica
habitual
FASE IV**

UNA BUENA EFICACIA NO SIEMPRE IMPLICA BUENA EFECTIVIDAD



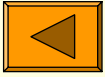
Correlato de protección



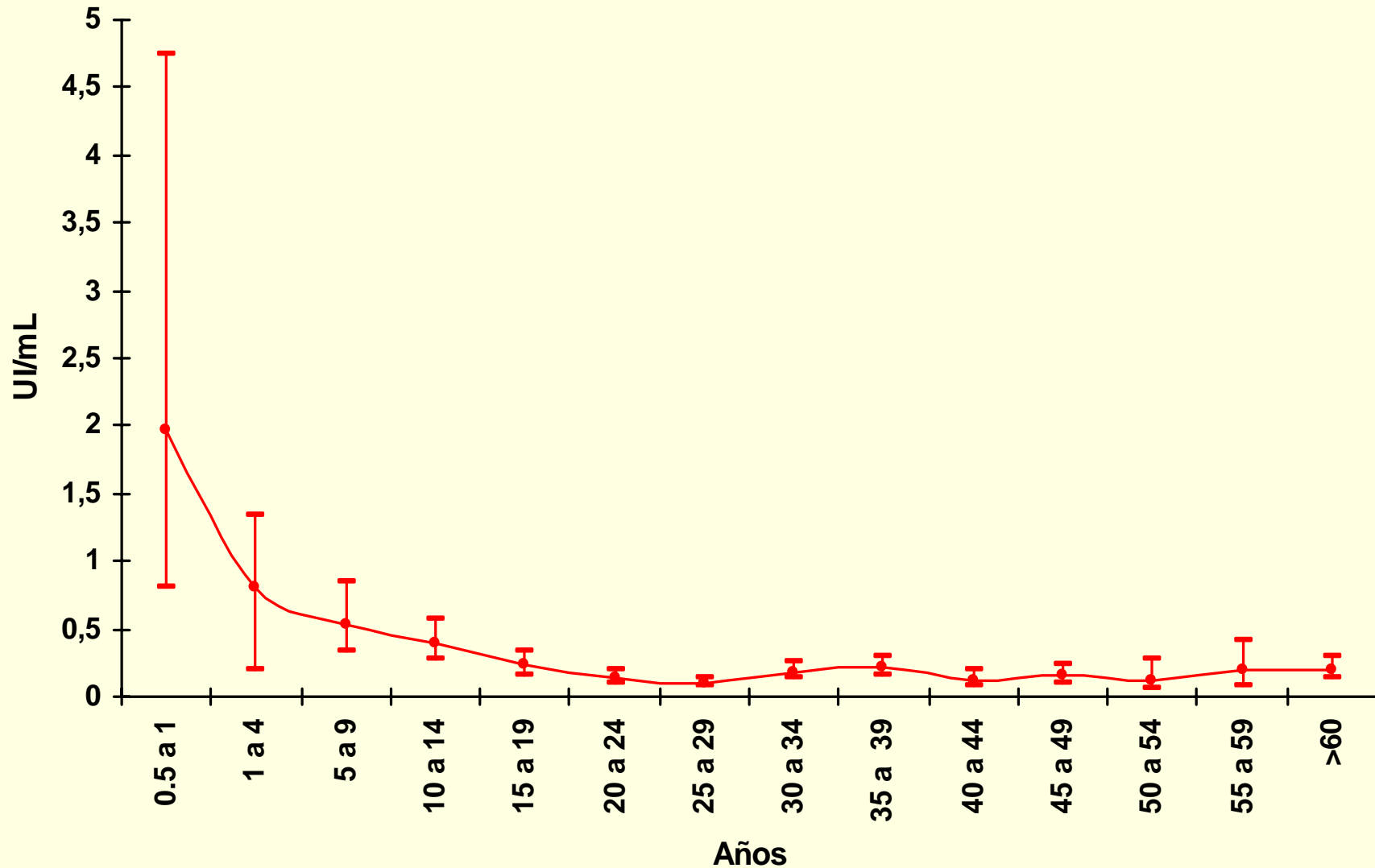


Criterios de evaluación

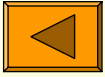
- **Valoración del incremento de los títulos de anticuerpos inducidos por un candidato vacunal**
- **Estimación del grado de protección cuando pueden establecerse correlatos de protección**



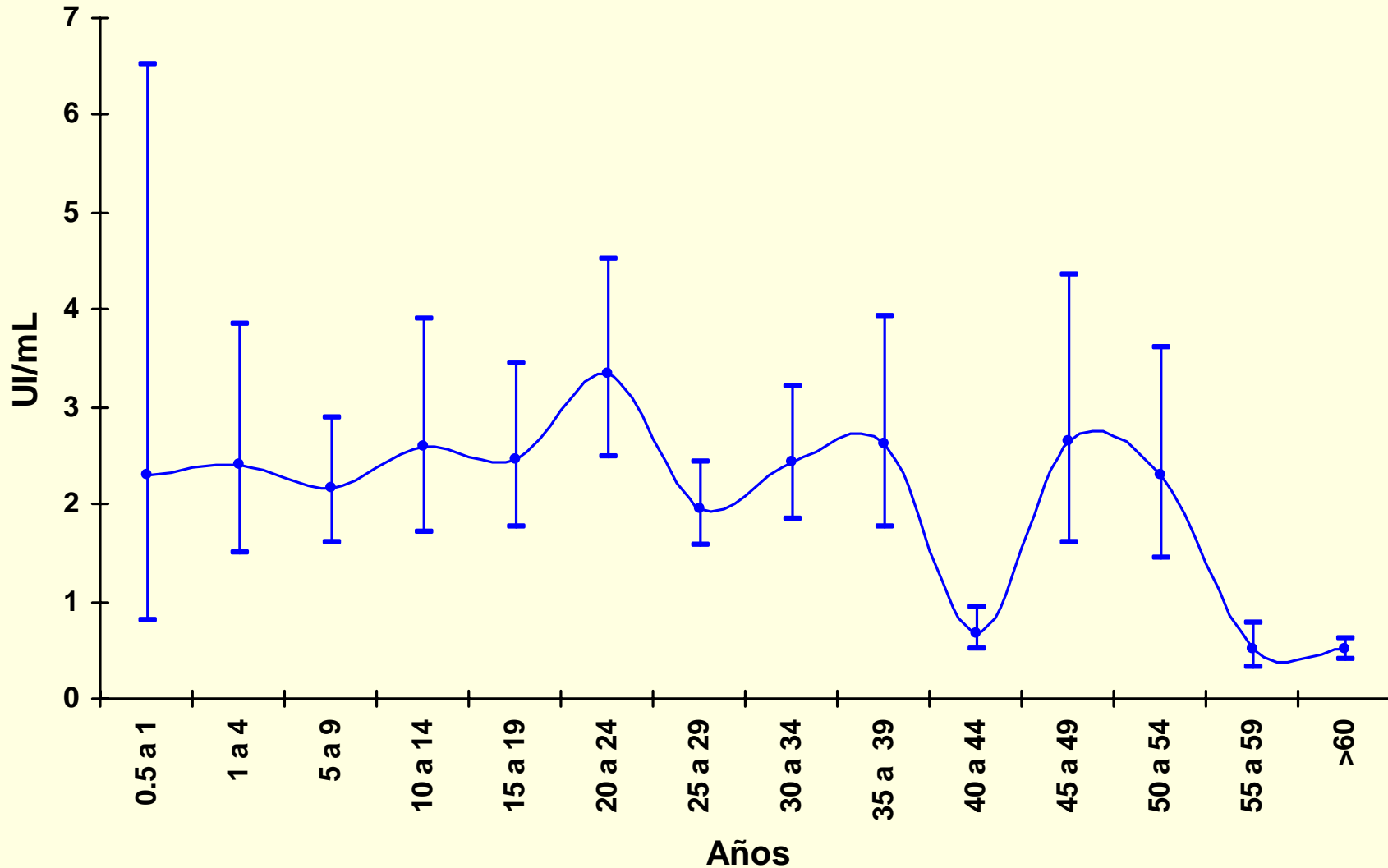
MG e IC 95 % de antitoxina diftérica por grupos de edad en el Municipio Alquizar, La Habana, 1999



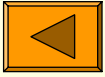
Peña GL. Seroprevalencia de antitoxina diftérica y tetánica en la población de Alquizar. (Tesis para optar por el título de Especialista de I Grado en MGI). Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana; 1999.



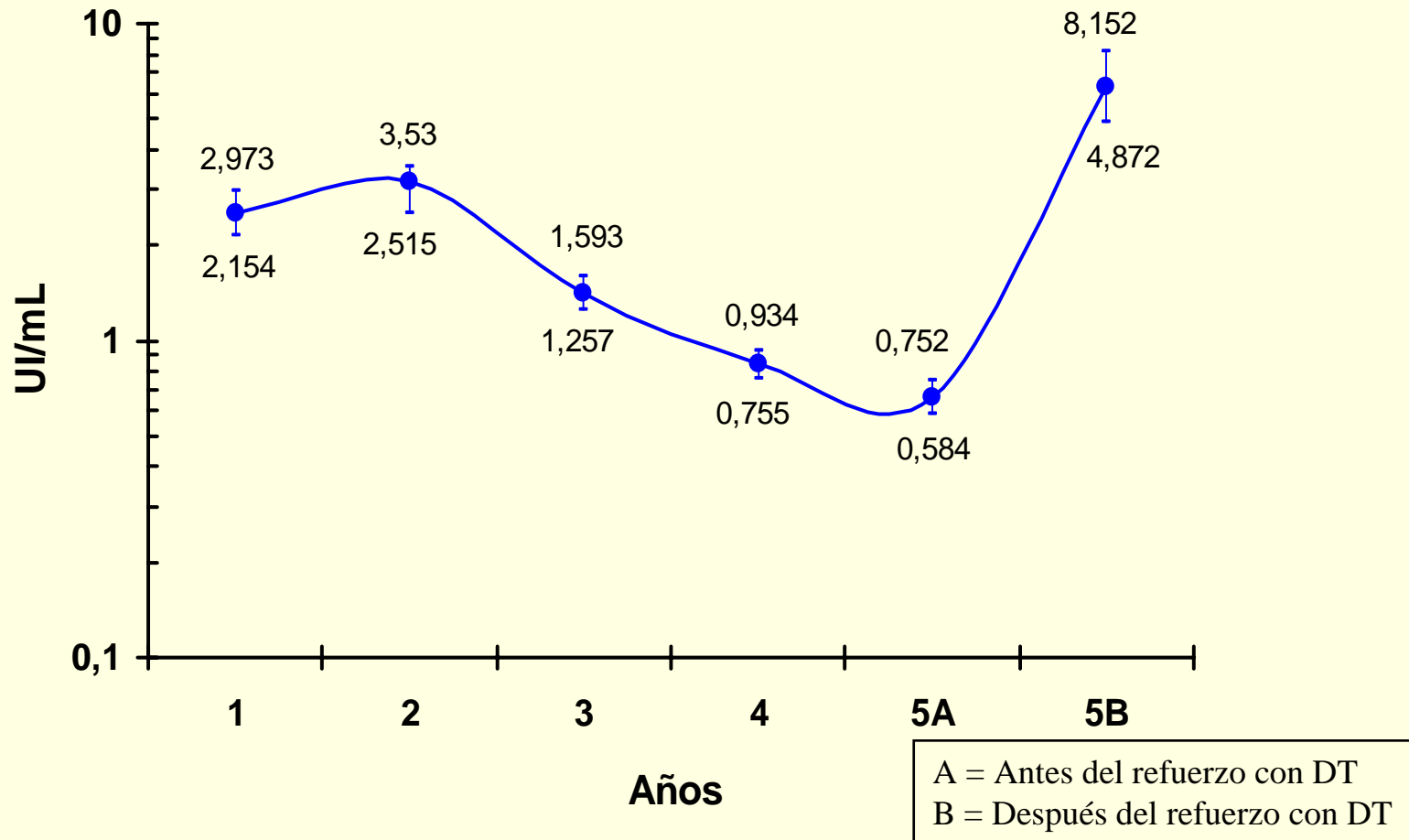
MG e IC 95 % de antitoxina tetánica por grupos de edad en el Municipio Alquizar, La Habana, 1999



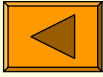
Peña GL. Seroprevalencia de antitoxina diftérica y tetánica en la población de Alquizar. (Tesis para optar por el título de Especialista de I Grado en MGI). Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana; 1999.



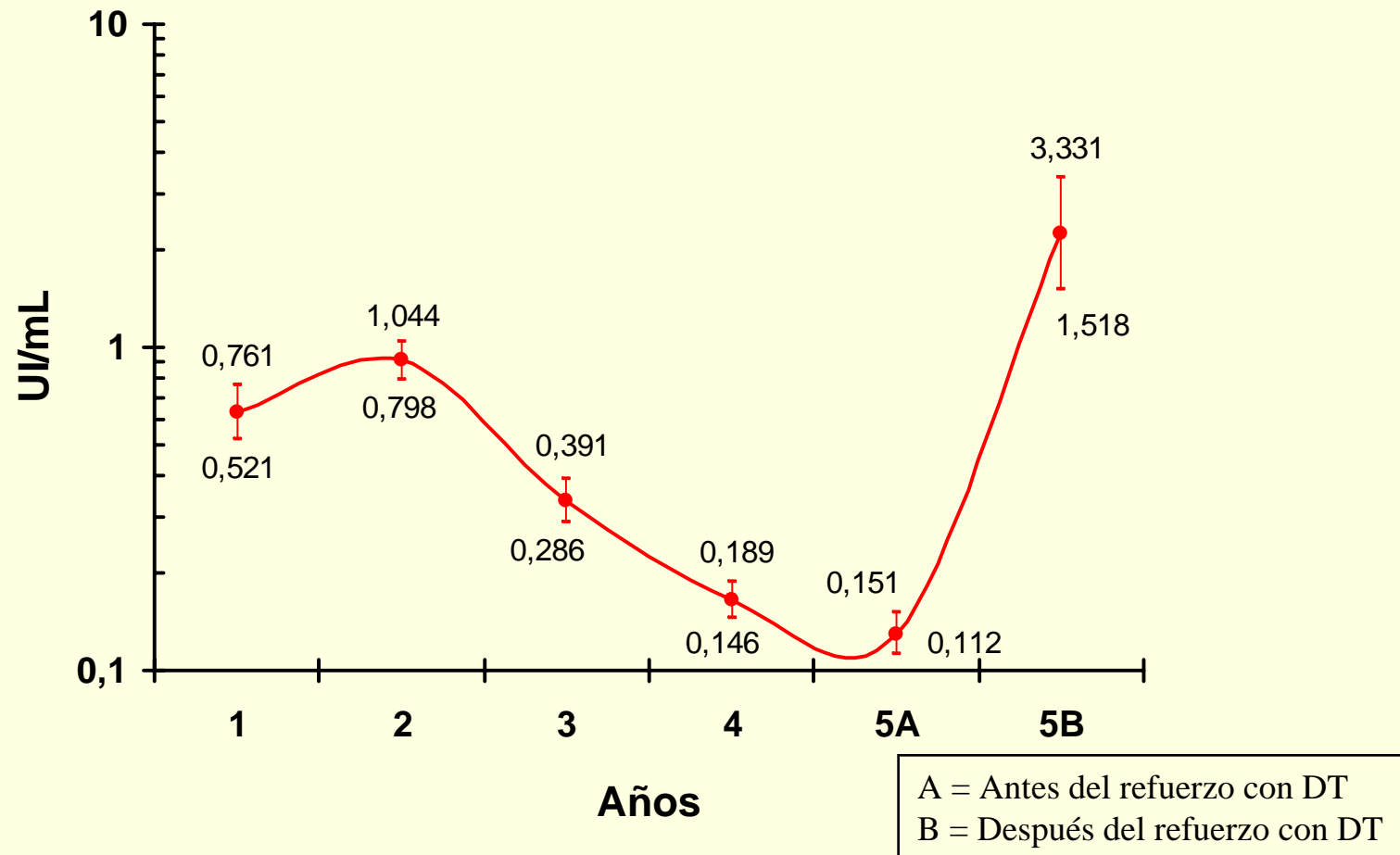
Distribución de antitoxina tetánica en niños cubanos de 1-5 años de edad



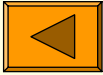
Ochoa RF, Martínez JC, Ferriol XR, Sotolongo FT. Niveles de antitoxina tetánica y diftérica en recién nacidos y niños preescolares cubanos. *Revista Cubana Med Trop* 2006;58(1):44-9.



Distribución de antitoxina diftérica en niños cubanos de 1-5 años de edad



Ochoa RF, Martínez JC, Ferriol XR, Sotolongo FT. Niveles de antitoxina tetánica y diftérica en recién nacidos y niños preescolares cubanos. *Revista Cubana Med Trop* 2006;58(1):44-9.



Distribución de antitoxina tetánica en niños cubanos de 1-5 años de edad

Edad (años)	N	Número (porcentaje)		
		<0,1 UI/mL	≥0,1 UI/mL	>1,0 UI/mL
1	242	1 (0,41)	241 (99,59)	184 (76,03)
2	268	0 (0)	268 (100,00)	240 (89,55)
3	283	2 (0,71)	281 (99,29)	194 (68,55)
4	314	10 (3,18)	304 (96,82)	144 (45,86)
5A	165	10 (6,06)	155 (93,94)	38 (23,03)
5B	84	0 (0)	84 (100,00)	79 (94,05)
Total	1356	23 (1,70)	1333 (98,30)	879 (64,82)

5A: Niños de 5 años de edad antes de recibir la dosis de refuerzo con DT

5B: Niños de 5 años de edad después de recibir la dosis de refuerzo con DT

Ochoa RF, Martínez JC, Ferriol XR, Sotolongo FT. Niveles de antitoxina tetánica y diftérica en recién nacidos y niños preescolares cubanos. *Revista Cubana Med Trop* 2006;58(1):44-9.



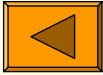
Distribución de antitoxina diftérica en niños cubanos de 1-5 años de edad

Edad (años)	N	Número (porcentaje)		
		<0,1 UI/mL	≥0,1 UI/mL	>1,0 UI/mL
1	242	20 (8,26)	222 (91,74)	91 (37,60)
2	268	10 (3,73)	258 (96,27)	138 (51,49)
3	283	51 (18,02)	232 (81,98)	60 (21,20)
4	314	88 (28,03)	226 (71,97)	11 (3,50)
5A	165	68 (41,21)	97 (58,79)	1 (0,61)
5B	84	2 (2,38)	82 (97,62)	64 (76,19)
Total	1356	239 (17,63)	1117 (82,37)	365 (26,92)

5A: Niños de 5 años de edad antes de recibir la dosis de refuerzo con DT

5B: Niños de 5 años de edad después de recibir la dosis de refuerzo con DT

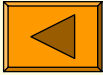
Ochoa RF, Martínez JC, Ferriol XR, Sotolongo FT. Niveles de antitoxina tetánica y diftérica en recién nacidos y niños preescolares cubanos. *Revista Cubana Med Trop* 2006;58(1):44-9.



Distribución de antitoxina tetánica en la pareja madre / recién nacido

UI/mL	Madres (96)		Recién Nacidos (96)	
	n	%	n	%
<0,1	0	0	0	0
≥0,1	96	100	96	100
>1	85	88,54	89	92,71
MG	3,260		4,688	
IC 95 %	2,705 – 3,928		3,873 – 5,674	

Ochoa RF, Acosta J, Ferriol XR, Ginebra M. Evaluación de anticuerpos contra enfermedades prevenibles por vacunas en el binomio madre-recién nacido en hospitales de Ciudad de La Habana. *VacciMonitor* 2007;16(2):16-20.



Distribución de antitoxina diftérica en la pareja madre / recién nacido

UI/mL	Madres (96)		Recién Nacidos (96)	
	n	%	n	%
<0,1	52	54,17	54	45,83
≥0,1	44	45,83	52	54,17
>1	0	0	1	1,04
MG	0,085		0,102	
IC 95 %	0,069 – 0,106		0,082 – 0,126	

Ochoa RF, Acosta J, Ferriol XR, Ginebra M. Evaluación de anticuerpos contra enfermedades prevenibles por vacunas en el binomio madre-recién nacido en hospitales de Ciudad de La Habana. *VacciMonitor* 2007;16(2):16-20.



Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze

Holguín, Cuba, 1951. Doctor en Medicina (MD). Doctor en Ciencias Médicas (PhD). Especialista de Primer y Segundo Grado en Inmunología.

Investigador Titular y Especialista de la Gerencia Médica del Instituto Finlay. Integrante de su Consejo Científico Técnico Superior.

Director de "Finlay Ediciones". Editor Científico de la Biblioteca Virtual de la "Red Latinoamericana de Información Científico Técnica en Vacunas".

Profesor Titular de la Universidad Médica de La Habana y la Escuela Latinoamericana de Medicina. Profesor Principal en Diplomados y Maestrías. Profesor de la Universidad Virtual de Salud y el Campus Virtual de la Organización Panamericana de la Salud.

Miembro de Tribunales de Especialidades Médicas, Maestrías y Doctorados, así como del Tribunal para la Categoría Docente Principal de Titular y Auxiliar.

Tutor y Asesor de numerosas Tesis de Doctorado, Maestría, Especialidades Médicas y Licenciatura.

Miembro Fundador y Titular de la Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología, de la Sociedad Cubana de Inmunología y de la Asociación Latinoamericana de Inmunología. Miembro de la Sociedad Cubana de Farmacología, de la Sociedad Cubana de Farmacia y del Grupo de Referencia del Brighton Collaboration.

Su participación en eventos científicos es amplia con alrededor de doscientos trabajos, la mayoría de ellos en el ámbito internacional. Ha publicado cinco libros y un centenar de artículos.

Autor de Registros Médicos Sanitarios en Cuba y varios países.

Ha participado en diversos proyectos de investigación, seis de ellos con la categoría de Premios Nacionales de la Academia de Ciencias de Cuba.

Posee la Orden "Carlos J. Finlay", la Medalla "Hazaña Laboral" y la Distinción "Juan Tomás Roig".

Los anticuerpos inducidos por vacunas o presentes en la población en estudios inmunoepidemiológicos, pueden ser medidos por técnicas *in vitro* no funcionales. Entre estos ensayos, el ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay) resulta la técnica de elección para determinar el grado de protección o la seroconversión inducida por una vacuna; también para evaluar la inmunidad poblacional, lo que está dado por su sensibilidad y detectabilidad, su elevada precisión y exactitud, y que con ella pueden procesarse lo mismo un número pequeño que grande de muestras.

Con la presente obra se pretende aumentar el conocimiento sobre esta técnica, de tal forma que permita no sólo seleccionar el ELISA apropiado, sino desarrollarlos en el caso de que no estén disponibles, así como interpretar los resultados; por lo que resulta útil en cualquier investigación, básica o aplicada, en los que se empleen los inmunoensayos como herramientas analíticas.



ISBN: 978-959-7076-47-6

