

Universidad de Ciencias Médicas de La Habana  
Centro Nacional de Genética Médica

## Estandarización y validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano

### Standardization and validation of an ELISA for quantifying titanic antitoxin in human serum

Cira Virgen Rodríguez Pelier<sup>I</sup>, Goitybell Martínez Téllez<sup>II</sup>, Bárbara Torres Rives<sup>III</sup>, Yaíma Zúñiga Rosales<sup>IV</sup>, Alexis Alles Gustavo<sup>V</sup>, Adonay Martínez Perera<sup>VI</sup>

<sup>I</sup> Licenciada en Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica. e.mail: cira@cngen.sld.cu

<sup>II</sup> Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. *Master* en Química Farmacéutica. Instructor. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. e.mail: goity@infomed.sld.cu

<sup>III</sup> Especialista Primer Grado en Inmunología. *Master* en Genética Médica. Profesor Auxiliar. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. e.mail: barbara@cngen.sld.cu

<sup>IV</sup> Especialista Primer Grado en Inmunología. Centro Nacional de Genética Médica. e.mail: yaima@infomed.sld.cu

<sup>V</sup> Licenciado en Microbiología. Centro Nacional de Genética Médica. e.mail: alles@cngen.sld.cu

<sup>VI</sup> Técnico auxiliar docente. Centro Nacional de Genética Médica. e.mail: ado@cngen.cld.cu

---

#### RESUMEN

**Introducción:** la cuantificación de antitoxina tetánica es útil para la evaluación de la respuesta inmune humoral frente a antígenos vacunales.

**Objetivo:** desarrollar la estandarización y validación técnica de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) de tipo indirecto para cuantificar antitoxina tetánica en suero humano.

**Material y Método:** el estándar preparado para la curva del ensayo se calibró frente al preparado en el Instituto Finlay. Se normalizaron los indicadores óptimos para el desarrollo de cada paso de la técnica.

**Resultados y Discusión:** durante la validación se alcanzó una buena precisión intraensayo e interensayo en todos los casos. Al evaluar el paralelismo el coeficiente de variación fue menor de 10%. El ensayo mostró una excelente exactitud, con valores de recuperación entre 90% y 110%. El límite de detección fue 0,002 UI/mL. La sensibilidad analítica alcanzada fue de 0,01 UI/mL.

**Conclusiones:** el ensayo puede ser utilizado para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano.

**Palabras clave:** antitoxina tetánica, ensayo inmunoenzimático, ELISA, validación.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** the Titanic antitoxin quantification is useful to assess the immune response against vaccinal antigens.

**Objective:** to develop a standardization and validation technique of the indirect ELISA to quantify titanic antitoxin in human serum.

**Materials and Methods:** the standard preparing to the assay curve was calibrated front the preparing Finlay Institute. The optimal indicators were normalized to each technique step developed.

**Results:** a good intra-assay precision was reach during validation in all cases. The coefficient of variation to parallelism was less than 10% and 110%. Detection limit was 0.002 UI/ ml. Analytic sensitivity reached was 0.01 UI/ ml.

**Conclusions:** the assay may be used to quantify Titanic antitoxin in human serum.

**Key words:** titanic antitoxin, inmuneenzimatic assay, ELISA, validation.

---

## INTRODUCCIÓN

El tétanos es una enfermedad infecciosa, frecuentemente mortal. La enfermedad continúa siendo un problema de salud pública importante en muchas partes del mundo, especialmente en los países más pobres, donde el tétano materno y neonatal es el factor dominante de la morbilidad y mortalidad de la enfermedad.<sup>1</sup>

En Cuba, el tétanos neonatal y la difteria desaparecieron en 1972 y 1979, respectivamente. Sin embargo, han persistido algunos casos aislados de tétanos en la población cubana. La necesidad de mantener niveles protectores de antitoxina contra el tétanos está relacionada con su vía de transmisión, su alta letalidad y la imposibilidad de adquirir inmunidad natural, de ahí que la eficacia del toxoide tetánico, esté dada fundamentalmente por la capacidad que tiene el individuo inmunizado de evitar la enfermedad.<sup>2</sup>

Las personas inmunodeprimidas constituyen un grupo de pacientes que presenta características especiales, tanto desde el punto de vista clínico como inmunológico. En los pacientes con inmunodeficiencia aumenta el riesgo de padecer tumores y enfermedades autoinmunes, todo ello como consecuencia de un mal funcionamiento y una mala regulación del sistema inmunitario.<sup>3</sup> La determinación de los valores de anticuerpos específicos para antígenos particulares puede ayudar a estimar la capacidad del individuo para activar una respuesta inmunitaria humoral.<sup>4</sup>

---

## OBJETIVO

Desarrollar una técnica ELISA para la determinación cuantitativa de antitoxina tetánica teniendo como referencia el método desarrollado por Ochoa y colaboradores, en el Instituto Finlay (La Habana, Cuba), con el propósito de contar con una herramienta para evaluar la respuesta inmune humoral mediante la determinación del nivel de anticuerpos séricos contra inmunógenos vacunales.

## MATERIALY MÉTODO

### Antígeno

Como antígeno de captura se utilizó la anatoxina tetánica producida y purificada por el Instituto Finlay (La Habana, Cuba).

El estándar de referencia utilizado fue preparado y purificado en el Instituto Finlay cuidadosamente estudiado contra el suero local de referencia (lote ATTRN <sup>1</sup>/1999) mediante la prueba de neutralización en ratones.

### Estándar del Laboratorio

Para la preparación del estándar del laboratorio y los controles se utilizaron bolsas de plasma procedentes del Banco de Sangre Provincial de La Habana, las que fueron sometidas a un proceso de recalcificación para obtener el suero. Se estabilizaron y conservaron con timerosal a 0,01%, a temperatura de -20°C. <sup>4, 5, 6</sup>

### Preparación de la curva estándar

El rango de trabajo de la curva se determinó analizando un total de 10 curvas, en las cuales se prepararon series de diluciones dobles seriadas y se seleccionó el trayecto correspondiente a un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mayor de 0,98. <sup>2,4,6</sup>

### Sueros controles

Se utilizaron sueros de alta, media y baja concentración de antitoxina tetánica, cubriendo el rango de trabajo de la curva de calibración. <sup>6,7</sup>

### Procedimiento

Se sensibilizaron placas ELISA (DERTALAB) durante una hora a 37°C en cámara húmeda, con 100  $\mu$ L por pocillo de Toxoide tetánico a 4  $\mu$ g /mL en amortiguador carbonato bicarbonato de sodio 0,05 M, pH 9,6. Se bloqueó con 100  $\mu$ L de leche descremada a 2% en Buffer fosfato+tuween20 (PBST). Las muestras fueron adicionada diluidas 1/120 (100  $\mu$ L /pocillos) y el conjugado anti-IgG humana peróxidasa (DAKO) desde 1/6000 hasta 1/14000 en PBST+LD 4%. El material no adsorbido después de cada paso se eliminó lavando la placa tres veces con 200  $\mu$ L por pocillo de PBST PH 7,2.

La cuantificación se realizó mediante un programa que utiliza una transformación logistic-log de cuatro parámetros.<sup>8</sup> El análisis estadístico se realizó con el paquete de herramientas para Excel y los programas Statgraphics Plus 5.0 y Statistical

### Determinación de las condiciones óptimas del ensayo

#### Evaluación del Recubrimiento

Se evaluaron concentraciones entre 1 µg/ml y 8 µg/ml. Se escogió como concentración óptima 4µg/ml donde se observó mayor discriminación entre el control positivo y el control negativo.

#### Dilución óptima del conjugado

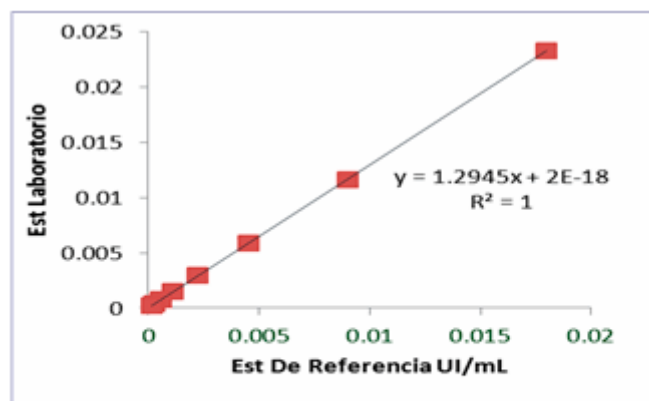
Se determinó por la mayor discriminación entre el suero estándar y los sueros negativos, según la prueba de análisis de varianza en 3 ensayos diferentes.

#### Cálculo de la dilución de la muestra

Se escogió, teniendo en cuenta que la densidad óptica obtenida para la mayor parte de los sueros analizados se encontrara dentro de la curva de calibración, que tuvieran un comportamiento paralelo con la curva de calibración y que permitiera evidenciar adecuadamente los niveles de antitoxina tetánica considerados como mínimos para conferir protección (0,01 UI/mL).

#### Evaluación de la curva de calibración

Para la evaluación de la curva de calibración se realizó un análisis de regresión lineal entre el estándar de referencia y el preparado en el laboratorio (Figura 1); se hicieron diluciones doble seriadas desde 1/100 hasta 1/3200 para ambos estándares.<sup>6, 7, 9,10</sup>



**Figura 1.** Regresión lineal entre los valores de concentración de antitoxina tetánica del estándar del Finlay y el estándar del laboratorio.

Los sueros controles que se prepararon para el chequeo de la calidad de la curva de calibración, abarcaron la zona central de la curva en un rango de 0,482 UI/ml hasta 0,872 UI/ml, teniendo en cuenta una dilución inicial para las muestras de 1/120. Todos presentaron una distribución normal según la prueba de Kolmogorov Smirnov. El procedimiento de clarificación, preservación y estabilización con

albúmina sérica humana al 6 % (p/v) permitió que el suero estándar alcanzara una alta estabilidad en condiciones de uso.<sup>6, 7, 9,10</sup>

## RESULTADOS

### Indicadores de validación

#### Precisión

Se obtuvo en todos los casos una imprecisión intraensayo menor de 10 % (Tabla 1). En la prueba de precisión interensayo predominaron coeficientes de variación menores de 20 % en la mayor parte de los ensayos.<sup>11, 12, 13,14</sup>

**Tabla 1.** Evaluación de la precisión intra e interensayo del ELISA

Muestras	Evaluación intraensayo						Evaluación Interensayo	
	Placa 1		Placa 2		Placa 3		X(UI/mL)	CV(%)
n= 18	X(UI/mL)	CV(%)	X(UI/mL)	CV(%)	X(UI/mL)	CV(%)	X(UI/mL)	CV(%)
1	10	6,6	9,7	6,6	10,2	5,5	10,0	2,5
2	5	8,7	5,0	5,5	5,4	7,6	5,1	4,3
3	2,8	0	3,3	0	3,1	0,1	3,1	8,9
4	1,1	0	1,3	7,0	1,4	0,5	1,3	15,8
5	0,7	8,3	0,5	5,8	0,7	0,1	0,6	18,2
6	0,3	8,3	0,3	6,6	0,4	10,0	0,3	24,1

X: Media de la concentración de antitoxina titánica. CV: Coeficiente de variación.

#### Selectividad

Como se observa en la Tabla 2, ninguna de las sustancias adicionadas al patrón alteraron los resultados y se obtuvo una recuperación entre 90 y 110 %.<sup>11, 12, 13,14</sup>

**Tabla 2.** Resultados de la evaluación del parámetro selectividad del método

	X	DS	CV	UI/mL	% R
Patrón (P)	2,352	0,085	3,59	0,01	96,3
P+monotriglicéridos	2,281	0,166	7,28	0,009	92,29
P+ Colesterol	2,254	0,093	4,11	0,009	91,6
P + EDTA	2,544	0,108	4,233	0,011	105

X (Promedio de las DO) DS (Desviación estándar). % R (Porcentaje de recuperación) UI/mL (Concentración de antitoxina tetánica).

#### Exactitud

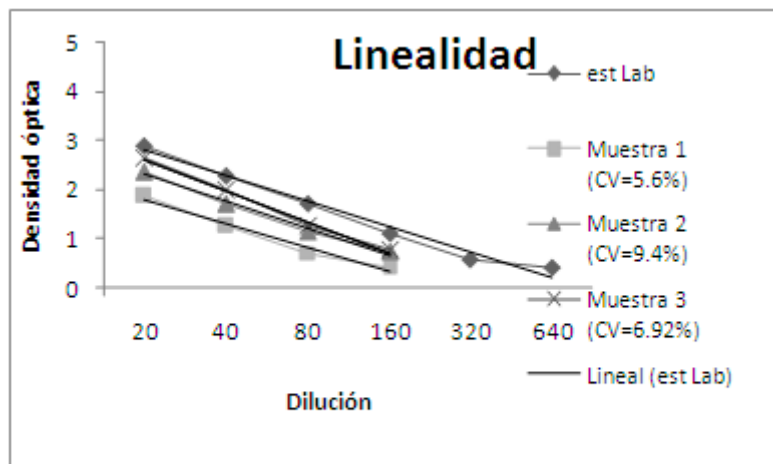
En la Tabla 3, se muestran los resultados obtenidos en tres ensayos utilizando como muestra el suero estándar de referencia con 6 concentraciones diferentes, el promedio de recobrado se mantuvo en 104,5%.<sup>11, 12, 13,14</sup>

**Tabla 3.** Recuperación del ELISA obtenida durante la evaluación de la exactitud

Diluciones	1	2	3	4	5	6
Valor esperado	10,00	5,00	2,82	1,20	0,60	0,30
1	10,00	5,00	2,82	1,05	0,70	0,30
2	9,39	5,01	3,39	1,33	0,50	0,25
3	10,20	5,39	3,09	1,44	0,70	0,40
Valor Obtenido	9,94	5,19	2,96	1,29	0,6	0,31
DS	0,44	0,21	0,36	0,15	0,10	0,06
CV	4,41	4,05	12,30	11,30	11,0	19,70
% Recuperación	99,40	104	105	108	106	105

### Linealidad

La Figura 2 muestra el comportamiento lineal del método al estudiar tres muestras en cuatro diluciones diferentes.<sup>11, 12, 13,14</sup>



**Figura 2.** Ensayo de paralelismo del ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica

### Límite de detección

La concentración mínima detectable que genera una respuesta consistentemente mayor que el valor de fondo del ensayo fue 0,002 UI/mL,

### Límite de cuantificación

El menor valor de concentración que fue detectado con una correcta exactitud y precisión fue 0,010 UI/mL.

Con este ELISA se puede cuantificar antitoxina tetánica, entre 0,010 y 0,32 UI/mL diluyendo la muestra 1:20; de 0,07 a 2.4 UI/mL con una dilución 1:120 y si se requiere cuantificar niveles superiores pueden hacerse mayores diluciones.

## DISCUSIÓN

El indicador precisión evalúa la posibilidad del método de aportar los mismos resultados en medios diferentes, asegurando que es capaz de brindar resultados similares en momentos diferentes y en condiciones distintas, ya sea de analistas, reactivos, e instrumentos. Los resultados obtenidos en la precisión de este método cumplen con lo establecido para una buena precisión en este tipo de ensayo.

Los resultados de precisión y exactitud obtenidos al analizar la selectividad confirmaron que ninguna de las sustancias utilizadas alteran los resultados del Patrón, corroborando que el método es capaz de seleccionar el analito para el cual fue creado entre otras sustancias presentes en el medio.

La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible al verdadero valor. El recobrado del sistema se ubicó generalmente en el intervalo comprendido entre  $\pm 10\%$  del valor esperado, lo que denota una alta exactitud del método.

Para que los resultados de cualquier método analítico sean válidos, es esencial que el analito en el suero estándar y en las muestras presente un comportamiento similar. En los resultados obtenidos al estudiar el indicador linealidad se observó que todas las diluciones mostraron, una vez corregidas con el factor de dilución, tan sólo pequeñas desviaciones del valor observado ( $CV < 10\%$ ), que no afectaron el paralelismo con la curva estándar.

## CONCLUSIONES

La alta precisión y exactitud alcanzada en la estandarización validan al ELISA, adecuado para evaluar la respuesta de anticuerpos contra el Toxoide tetánico y puede ser especialmente útil en estudios seroepidemiológico y la evaluación de la respuesta inmunitaria humoral.

## Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecemos el apoyo recibido por la dirección de producción del Instituto Finlay y en especial al profesor DrC. Rolando Ochoa Azze por los conocimientos impartidos directamente y a través de sus libros y artículos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Summary guide to tetanus prophylaxis in routine wound management. En: Heymann DL. Control of communicable diseases manual. 18<sup>a</sup> ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2004, p. 532.
2. Ochoa R, Martínez JC, Fajardo EM, Álvarez E, Estrada E, García AM, *et al*. Validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano. *VacciMonitor*. 2000; 9(4): 16-21.

3. Jauma A, Ínsua C, Macías C, González C, Bericiartu M. Respuesta inmune-celular y humoral en niños inmunodeprimidos vacunados con la vacuna cubana anti-hepatitis B. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2009; 8(2): 1-7.
4. Parslow T, Stites D, Terr A. *Inmunología Básica y Clínica*. 10ma ed. Ciudad México: El Manual Moderno; 2001.
5. Mena López L, Núñez Mesa C, Pérez Cabarco N, Fernández Estrada J, Muñoz Fernández R, López Molina L, *et al*. Valoración de la titulación de anticuerpos antitetánicos por UMELISA en donantes especiales. *Rev Cubana Hematol. Inmunol Hemoter* [revista en Internet]. Dic,2001;17(3):194-200. [Citado 2010 Nov 17]. Disponible en: <http://www.scielo.sld.cu/>.
6. Ochoa R. Sistema ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos. [Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencias Médicas]. Ciudad de La Habana: Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, Instituto Finlay; 2001.
7. Ochoa R. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Segunda edición ampliada. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008.
8. Pliikaytis BD, Carlone GM. Program ELISA for Windows User's Manual, version 2. Atlanta, GA, U.S.A.: Centers for Disease Control and Prevention; 2005.
9. Ochoa R, Martínez J, Ferriol X, Estrada E, García A, Blanco R. Guía para la Estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor*. 2000;9(3):13-8.
10. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Jul;23(3):550-76.
11. Nerey M, Ochoa R, Martínez JC, Licea T, Ferriol X, *et al*. Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG anti-polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C. *Biotecnología Aplicada*. 1999; 16: 113-115.
12. Valderrama S, Pérez E, Aldama Y, Costa L, Quintana M, Pérez G, García G. Establecimiento y validación de un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA, empleado en el control de la calidad del interferón alfa2b humano recombinante. *Vaccimonitor*.2009; 18(1): 8-13.
13. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores. Regulación No. 47. 2007.
14. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Validación de Métodos Analíticos. Regulación No. 41. 2007.

Recibido: 15 de enero de 2013

Aprobado: 22 de octubre de 2013