

INSTITUTO "FINLAY"

## Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG humana antiproteína de *Neisseria meningitidis* serogrupo B

Lic. Xenia Ferriol Marchena,<sup>1</sup> Lic. Ana M. García Malberti,<sup>2</sup> Dr. Rolando Ochoa Azze,<sup>3</sup> Téc. Iovagna Bravo Verde,<sup>4</sup> Dr. Rosa Blanco González,<sup>3</sup> Dr. Eric Estrada González,<sup>5</sup> Lic. Mayte Nerey Olivares<sup>1</sup> y Lic. Juan Carlos Martínez Rodríguez<sup>6</sup>

### RESUMEN

Se optimizó un ELISA de tipo indirecto en el cual se usan como antígenos de captura las proteínas de membrana externa del meningococo B presentes en la vacuna cubana VA-MENGOC-BC®. La presencia de anticuerpos específicos en muestras de sueros extraídas de individuos vacunados fueron detectadas con un conjugado anti-IgG humana: fosfatasa alcalina, revelándose la reacción con el sustrato específico p-nitrofenilfosfato. Se obtuvo el suero estándar a partir de un estándar de referencia, el rango de la curva de calibración es de 625 a 20 000 U/mL. Se seleccionó el suero control en la zona de mayor interés para las muestras y se determinaron las características del ensayo, cuya imprecisión intraensayo, interensayo y total fueron inferiores al 10 % en la zona más lineal de la curva. La detectabilidad fue de 700 U/mL. Los estudios de recuperación, paralelismo y linealidad muestran una inexactitud inferior al 10 %.

**Descriptores DeCS:** NEISSERIA MENINGITIDIS; MENINGITIS MENINGOCOCICA/diag/ inmunol/terap; TEST DE ELISA/métodos; VACUNAS.

La infección por *Neisseria meningitidis* es una condición peligrosa para la vida, que puede tener varias formas clínicas de presentación.<sup>1</sup> La meningitis meningocócica tiene aún una significativa mortalidad y morbilidad al margen del sustancial progreso en el diagnóstico y tratamiento. La inmunización activa es la única y real solución para reducir la incidencia de estas infecciones por un largo período.<sup>2</sup> Debido a la situación epidémica en Cuba en el año 1982, se inició un intenso programa dirigido a investigar y desarrollar una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad meningocócica producida por el

meningococo B, que culminó en 1989 con los estudios de eficacia de VA-MENGOC-BC.<sup>3-5</sup> Después de la evaluación y aprobación, la vacuna ha sido aplicada en campañas de vacunación en Cuba y otros países y se reconoce como la primera vacuna eficaz en la prevención de la enfermedad meningocócica causada por el serogrupo B.<sup>6-8</sup> En el Instituto "Finlay", además de producirse la vacuna antimeningocócica BC se desarrollan investigaciones de forma sistemática sobre este microorganismo para profundizar en el conocimiento de esta bacteria, así como evaluar de forma permanente el

<sup>1</sup> Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora.

<sup>2</sup> Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada.

<sup>3</sup> Especialista de II Grado en Inmunología.

<sup>4</sup> Técnico Medio en Procesos Biológicos.

<sup>5</sup> Especialista de I Grado en Inmunología.

<sup>6</sup> Licenciado en Radioquímica. Aspirante a Investigador.

comportamiento de esta infección en nuestro país y en otros del área que se puedan beneficiar con el empleo de nuestra vacuna. Se han realizado varias investigaciones dirigidas a evaluar la inmunogenicidad de las proteínas vacunales, centrando la atención en análisis de seroconversión<sup>8,9</sup> y en general para la evaluación de la eficacia de la vacuna cubana.

En el presente trabajo se optimiza un ELISA de tipo indirecto para la cuantificación de anticuerpos isotipo IgG antiproteínas de membrana externa del meningococo B en suero de individuos vacunados. Se analizan algunas características del ensayo como la concentración óptima de recubrimiento, la imprecisión intra, interensayo y total, la detectabilidad y se evaluaron la curva estándar y la exactitud mediante pruebas de paralelismo, linealidad y recuperación y se determinó el rango del suero control.

## MÉTODOS

*Antígeno.* El antígeno utilizado para el recubrimiento de la fase sólida se logró en el Instituto "Finlay" a partir de la obtención de vesículas de proteínas de la membrana externa del meningococo B cepa B:4:P.1.15, las cuales contienen el principio activo proteico de VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>.

*Preparación del estándar secundario, suero control y muestras.* Para la selección del *estándar secundario* se analizaron 84 sueros de adultos vacunados con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>. De éstos se tomó uno de alto título que fue diluido con una cantidad apropiada de albúmina de suero humano (HSA) al 6 % en solución salina tamponada con fosfato (SSTF) 0,15 M pH 7,3 hasta una concentración de 20 000 U/mL con respecto al estándar de referencia. La curva de calibración de 6 puntos se obtuvo por diluciones dobles seriadas.

*Suero control.* El suero control fue seleccionado también de los sueros mencionados anteriormente. Se diluyó con una cantidad apropiada de HSA al 6 % y se estableció un rango adecuado para el análisis de las muestras. Para ello se realizaron 549 repeticiones. La determinación de la normalidad se realizó por la prueba de Kolmogorov Smirnov.<sup>10</sup>

*Muestras.* Las muestras se ensayaron a una dilución 1:200. Se hicieron diluciones mayores en aquellos casos con densidades ópticas superiores al primer punto de la curva estándar, así como en las pruebas de dilución. La solución diluyente para muestras, estándar y control fueron SSTF 0,15 M con tween 20 al 0,05 % y leche desnatada (Merck) al 3 %.

*Selección de la concentración óptima de recubrimiento.* Para la selección de la concentración óptima de recubrimiento se sensibilizó la placa con las vesículas de proteínas de membrana externa del meningococo B (proteína vacunal) en concentraciones desde 0,15 µg/mL hasta 20 µg/mL en diluciones dobles seriadas.

*Ensayo inmunoenzimático.* Para la cuantificación de IgG antiproteínas de VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> se diseñó un ELISA de tipo indirecto según el procedimiento que se describe a continuación.

El recubrimiento se realizó con proteínas de membrana externa del meningococo B, en solución reguladora carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6; se depositaron 100 µL de esta dilución en cada pocillo de una placa de poliestireno de alta capacidad (COSTAR cod 3590, EE.UU.). La placa se incubó 16 h a 4 °C en cámara húmeda. Después de lavar con SSTF 0,15 M con tween 20 al 0,05 % (solución de lavado), se añaden 100 mL por pocillo de diluciones seriadas del estándar, suero control, y muestras diluidas 1:200 en solución diluyente y se incubó 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Pasado este tiempo las placas se lavan de nuevo y se añaden 100 µL por pocillo de un conjugado anti-IgG humana fosfatasa-alcálica (Sigma EE.UU.) diluido 1:2 000 en el mismo diluyente y se dejó reaccionar 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Por último, después de un lavado final se añadió el sustrato p-nitrofenilfosfato (pnpp) en solución reguladora de dietanolamina 0,92 M pH 9,8 y se incubó a temperatura ambiente hasta que el primer punto de la curva alcanzara un valor de DO aproximado de 1,3 a 1,4. La lectura se realizó en un lector de ELISA Anthos Labtec a 405 nm. Las muestras se cuantificaron mediante la utilización de un programa de computación aportado por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta,

EE.UU., basado en una transformación logístico-log con 4 parámetros.<sup>11</sup>

*Parámetros de calidad del ELISA.* Para evaluar las características del sistema<sup>12,13</sup> se analizaron los parámetros siguientes:

- a) Precisión. La variación intraensayo fue comparada ensayando 5 muestras de diferentes concentraciones, probándose 10 réplicas de cada muestra en 3 placas. La variación interensayo se determinó con los valores promedios de cada una de las muestras evaluadas. La variación total fue comprobada analizando la variación de todas las muestras, dentro y entre los ensayos. El coeficiente de variación (CV %) se determinó para estimar la variación estadística de la media de las réplicas.
- b) Exactitud. Se analizó mediante la prueba de recuperación, se seleccionó para ello una muestra libre de anticuerpos contra las proteínas vacunales, a la que se le añaden diferentes volúmenes de muestras de concentraciones conocidas. El porcentaje de recuperación se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Valor obtenido U/mL} / \text{Valor teórico U/mL} \times 100$$

Siendo el valor teórico = Concentración calculada x volumen de la muestra evaluada / Volumen de la muestra evaluada + volumen de la muestra libre de anticuerpos.

Se consideró como óptimo un porcentaje de recuperación entre el 90-110 % y aceptable entre 80 - 90 % y 110 - 120 %.

- c) Evaluación de la curva estándar.
  - Paralelismo. Para la prueba de paralelismo se tomaron 5 muestras con concentraciones variables. A cada una se le realizaron diluciones seriadas desde 1:800 hasta 1:3 200 y se realizaron 4 repeticiones de cada dilución. Se consideró como óptimo si la dispersión de los valores era inferior al 10 %.
  - Linealidad. Se tomaron 24 muestras que presentaban concentraciones entre 20 000 y 5 000 U/mL y se hicieron 12 parejas que combinaban las de mayor y menor concentración. Se aplicaron 4 veces las muestras individuales y las mezclas en la placa. Como exce-

lente se consideraron los valores  $\pm 10 \%$  con respecto al valor teórico.

- e) Detectabilidad. Para el estudio del límite de detectabilidad se realizaron 18 repeticiones de blanco reactivo en 3 placas diferentes y se le calculó la media ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar (DE) para cada placa. La detectabilidad se calculó por la fórmula  $X \pm 2 \text{ DE}$ .

## RESULTADOS

Los valores de absorbancia aumentan proporcionalmente a la concentración de recubrimiento hasta  $10 \mu\text{g/mL}$ , a partir del cual se mantienen constantes, como concentración óptima de recubrimiento se tomó  $20 \mu\text{g/mL}$  (fig. 1).

El coeficiente de variación intraensayo (tabla 1) medido para 5 concentraciones y repetido en 3 placas diferentes es menor que el 10 % en el 2do., 3er. y 4to. segmentos de la curva y entre 10 y 15 % en el 1ro. y 5to. segmentos. Un comportamiento similar ocurre con el coeficiente de variación interensayo, como CV promedio se obtuvo 9,09 %. En el caso del coeficiente de variación total se logró un CV promedio de 12,30 % y en todos los casos el CV fue inferior al 20 % (tabla 2).

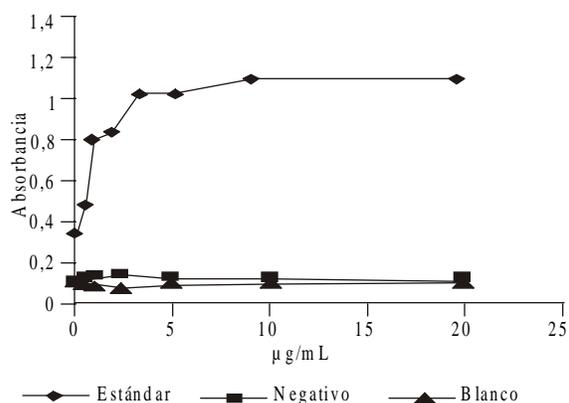


Fig. 1. Concentración óptima de recubrimiento.

TABLA 1. Precisión intraensayo del ELISA de proteína VA-MENGOC-BC®

Muestras	Placa 1		Placa 2		Placa 3	
	$\bar{X}$ (U/mL)	CV (%)	$\bar{X}$ (U/mL)	CV (%)	$\bar{X}$ (U/mL)	CV (%)
1	18 342	10,26	13 771	10,59	18 952	6,33
2	10 178	9,75	9 504	8,43	10 233	4,26
3	5 111	7,94	4 581	9,69	5 104	5,27
4	2 582	9,68	2 756	10,49	2 427	8,57
5	1 380	15,87	1 579	15,0	1 238	12,28

TABLA 2. Precisión interensayo y total del ELISA de proteína VA-MENGOC-BC®

Muestras	Interensayo			$\bar{X}$ (U/mL)	Total	
	$\bar{X}$ (U/mL)	DE $\bar{X}$ (U/mL)	CV (%)		DE (U/mL)	CV (%)
1	17 022	2 832	16,63	17 022	27,82	16,34
2	9 972	406	4,07	9 972	817	8,19
3	4 932	304	6,16	4 932	443	9,98
4	2 588	165	6,37	2 588	276	10,66
5	1 399	171	12,22	1 399	243	17,36

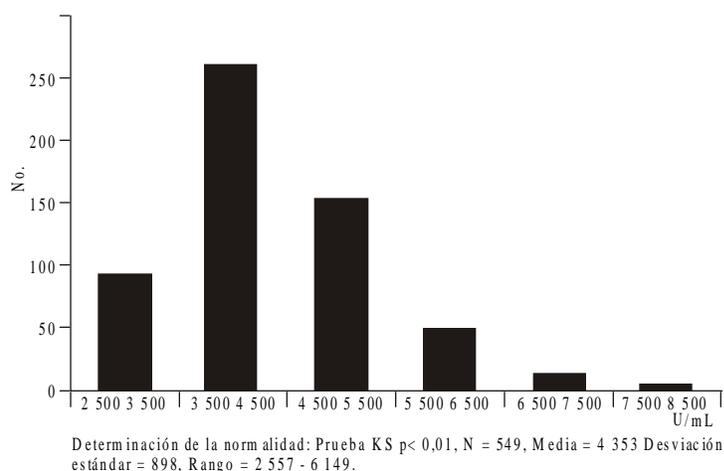


Fig. 2. Rango del suero control del ELISA de proteína de VA-MENGOC-BC®.

El rango del suero control fue entre 2 557 y 6 149 describiendo una distribución normal según la prueba de Kolmogorov Smirnov (fig.2). El rango de la curva se extiende desde 20 000 U/mL hasta 625 U/mL. El análisis de correlación entre el estándar secundario y el estándar de referencia mostró un coeficiente de correlación de 0,9958 con pendiente 1,0253 e intercepto de -132,47 (fig. 3).

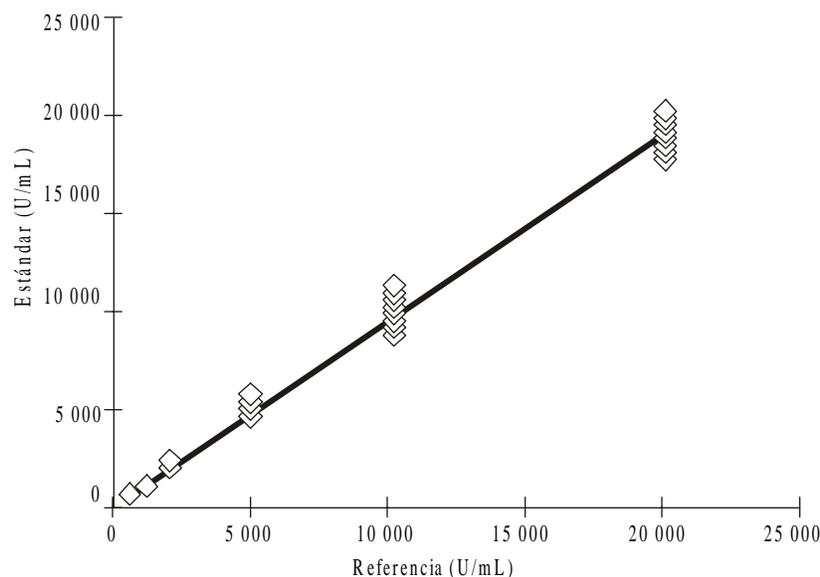
La recuperación del sistema entre los segmentos 2do., 3ro. y 4to. se encuentra dentro de los valores óptimos y en el 1ro. y 5to. segmentos discretamente superiores. La recuperación promedio fue de 99,78 % (tabla 3). La prueba de paralelismo realizada para 5 muestras en 3 diluciones diferentes mostró un

TABLA 3. Recuperación del ELISA de proteína VA-MENGOC-B®

Muestra	Valor esperado (U/mL)	Valor obtenido (U/mL)	Recuperación (%)
1	20 000	17 022	85,11
2	10 000	9 772	99,72
3	5 000	4 932	98,64
4	2 500	2 588	103,54
5	1 250	1 399	111,92

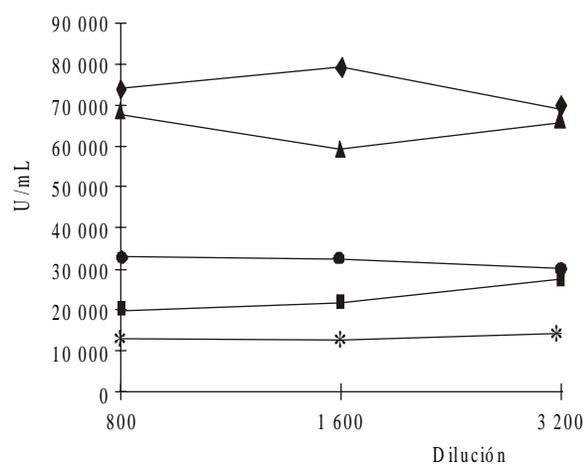
comportamiento similar en el rango de medición evaluado (fig. 4). En todos los casos el CV fue menor que 10 %.

En la prueba de linealidad se obtuvieron valores entre 93 y 108 % respecto al valor teórico (tabla 4). Se detuvo una detectabilidad de 700 U/mL, para una  $n = 54$ ,  $\bar{X} = 281$  y  $DE = 209,5$ .



Ecuación de regresión:  $y = 1,0253x - 132,47$ , Coeficiente de correlación:  $r = 0,9958$ ,  $N = 144$

Fig. 3. Correlación entre el estándar secundario y el de referencia.



◆ Muestra 1 ■ Muestra 2 ▲ Muestra 3 ● Muestra 4 \* Muestra 5

Fig. 4. Paralelismo del ELISA de proteína VA-MENGOC-BC®.

TABLA 4. Linealidad del ELISA de proteína VA-MENGOC-BC®

Muestra X (U/mL)	Muestra Y (U/mL)	Valor esperado X + Y (U/mL)	Valor obtenido X + Y (U/mL)	%
4 045	11 495	7 770	7 836	100,8
3 031	9 144	6 087	6 490	106,6
4 436	15 407	9 922	9 446	95,2
4 426	9 490	6 958	6 498	93,4
5 101	8 566	6 834	6 545	95,8
6 330	11 937	9 134	9 452	103,5
7 748	10 079	10 913	10 302	94,4
7 607	2 995	5 301	5 661	106,8
11 893	3 834	7 863	7 508	95,5
6 981	3 932	5 456	5 896	108,1
12 031	5 573	8 802	9 145	103,9
11 533	3 697	7 615	7 669	100,7

## DISCUSIÓN

VA-MENGOC-BC® es la única vacuna comercialmente disponible en el mundo para el serogrupo B,<sup>7</sup> por este motivo fue necesario validar un ELISA de tipo indirecto que utiliza las vesículas de membrana externa de la vacuna como antígeno de captura, de ahí que sea el único ELISA con estas características disponible en la actualidad y útil para evaluar la efectividad y eficacia de este preparado vacunal.

Para la validación del ELISA se analizaron diferentes parámetros como: concentración óptima de recubrimiento, selección de la curva estándar, correlación entre el estándar secundario y el de referencia, precisión y exactitud.

En los ELISA de tipo indirecto debe seleccionarse como concentración óptima de recubrimiento aquella que se encuentre en la zona de meseta. En la figura 1 se muestran las densidades óptimas (DO) obtenidas con las diferentes concentraciones de recubrimiento. Las densidades más altas se observaron a partir de la concentración de 10 µg/mL y se mantuvieron luego constantes, lo que coincide con lo reportado por algunos autores.<sup>14</sup> Tomando como base este resultado, se decidió utilizar 20 µg/mL para la sensibilización de las placas

en nuestro ensayo, y garantizar así un recubrimiento óptimo.

La dispersión obtenida de los resultados de una muestra procesada varias veces se define como precisión y para su evaluación exploramos la intraensayo, interensayo y el total. Empleamos como criterio de calidad óptimo el alcanzar un CV menor que 10 % para el análisis intraensayo, y entre 10 y 20 % para el interensayo y el total, por lo que puede valorarse como buena la precisión alcanzada en esta prueba. En el interensayo, el 1er. y 5to. segmentos presentan una menor precisión, aunque menor que el 20 %, dada por la baja concentración de la muestra y por tanto, menores DO en el segmento inferior (5to. segmento) y por una menor pendiente en el caso del segmento superior (1er. segmento).

El rango del suero control mostró una distribución normal (fig. 2) y se ubicó entre el segundo y el cuarto puntos de la curva según la dilución de trabajo, siendo este segmento óptimo en términos de precisión y exactitud. Este rango permite controlar la calidad de la preparación de la curva estándar, ya que los ensayos sólo deben ser aceptados cuando el suero control muestre valores de concentración dentro de éste.

Se preparó una curva estándar de 6 puntos a partir de una dilución 1:200 hasta 1:6 400. El rango de la curva permitió cuantificar entre 20 000 y 625 U/mL con la dilución de trabajo de 1:200, a esta dilución, los valores de concentración de IgG anti-proteína B de la mayoría de las muestras de suero estudiadas con este sistema, se encuentran dentro del rango de valores de la curva estándar, lo que nos permite confirmar la utilidad de la dilución de trabajo seleccionada por nosotros. El análisis de correlación entre el estándar secundario y el estándar de referencia indica la similitud entre los 2 estándares y por tanto, las mediciones con ambos patrones (fig. 3). La exactitud es el grado de identidad de valores analíticos obtenidos con un método y el contenido real del parámetro.

La recuperación del sistema para 5 muestras diferentes se ubica desde 85 y 111 %; el valor promedio del recobrado es de 99,78 %, lo que permite afirmar la alta exactitud obtenida, aunque en la primera y última muestras correspondientes al primero y último puntos de la curva los valores son ligeramente superiores al 10 %, dada por la baja concentración de la muestra y por tanto menor DO

en el segmento inferior, y por una menor pendiente en el caso del segmento superior.

La prueba de paralelismo de las muestras ensayadas mostró una independencia del valor de la concentración de cada muestra de la dilución de trabajo utilizada, para el rango de medición evaluado. La prueba exhibió un coeficiente de variación entre las muestras inferior al 10 % (fig. 4).

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

Estos resultados avalan la adecuada linealidad de la curva estándar y se corresponden con los reportados por otros autores para sistemas ELISA,<sup>15</sup> lo cual posibilita confiar en estudios posteriores con esta técnica *in vitro*.

Se define como límite de detección o detectabilidad, a la mínima cantidad detectable por un método analítico, es decir, la cantidad mínima diferenciable de O, que en nuestro caso fue de 700 U/mL. Pensamos que este límite de detección es adecuado para nuestros propósitos, si se tiene en cuenta el rango de cuantificación empleado.

Para evaluar esta vacuna se han empleado los términos de seroconversión y serorrespondedor, dados por un incremento en la concentración de anticuerpos con respecto a los valores obtenidos previa vacunación, mayores que 4 en el primer caso y que 2 para el segundo.<sup>8,9</sup> Aquellos valores inferiores al límite de detección deben sustituirse por su mitad,<sup>16</sup> en este caso 350 U/mL, de esta manera la clasificación de la respuesta es más objetiva, sobre todo para aquellos valores extremadamente bajos detectados en las muestras tomadas antes de comenzar el esquema de vacunación.

Este ELISA de apropiada precisión y exactitud, caracterizado de forma adecuada, es útil para ser usado en la evaluación del componente proteico de VA-MENGOC-BC® y probablemente en estudios seroepidemiológicos para explorar la respuesta contra las proteínas de membrana externa del meningococo B cepa B4P1.15.

## SUMMARY

An indirect ELISA test was optimised in which B meningococcus outer membrane proteins included in the Cuban Vaccine known as VA-MENGOC-BC were used as capture antigens. Specific antibodies

in serum samples from vaccinated individuals were detected using a human anti-IgG conjugate, i.e. alkaline phosphatase, thus the reaction developed with a specific substrate called p-nitrophenylphosphate. Standard serum was obtained from a reference standard, the gage curve range was 625 to 20 000/mL. The control serum was selected from the most interesting areas for the samples, hence, assay characteristics were determined. Intra-assay, inter-assay and total inaccuracies were lower than 10 % in the most linear area of the curve. Detectability was 700/mL. Recovery, paralelism and linearity studies showed an under 10 % innaccuracy.

**Subject headings:** NEISSERIA MENINGITIDIS; MENINGITIS; MENINGOCOCCAL/diagnosis; MENINGOCOCCAL/inmunol; MENINGOCOCCAL/therapy; ENZYM-LINKED; IMMUNO-SORBET ASSAY/methods; VACCINES.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buckmaster ND, Boyce N. Two unusual presentations of N.m infection. *Med J Aust* 1993;58:266.
- Jones DM. Current and future trends in immunization against meningitis. *J Antimicrob Chemother* 1993;31(Suppl B):93-9.
- Varcárcel M, Rodríguez R, Terry H. La enfermedad meningocócica en Cuba. *Cronología de una epidemia*. 1 rev. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1991:111-229.
- Sierra VG, Campa C, Varcárcel M. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* 1991;14:195.
- Sierra VG, Campa C, García L, Sotolongo F, Izquierdo L. Efficacy evaluation of the Cuban vaccine VA-MENGOC-BC against disease caused by serogroup B *Neisseria meningitidis*. En: Achtman M, Kohl P, Marchal C, Morreli G, Seiler A, Thiesen B, eds. *Neisseriae 1990*. Berlin: Ed. Walter de Gruyter, 1991:129-34.
- Milagres LG, Ramos SR, Sacchi CT, Menes CA. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. *Infect Immun* 1994;62:4419-24.
- Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC. Protective efficacy of serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil Public Health. *Lancet* 1992;31:1071-8.
- Respuesta inmune humoral a las proteínas de una vacuna antimeningocócica en un ensayo realizado en Antioquia, Colombia. *Bol of Sanit Panam* 1995;118(4):285-94.
- Fernández J, Malberty J, Sotolongo F, Bacallao J, Camaraza M, et al. Cinética de la respuesta de anticuerpos bactericidas y de la IgG específica en individuos vacunados con VA-MENGOC-BC. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1997;13(1):38-45.
- Statgraphics® plus for Windows™ Version 1.0. Statistical Graphics. Corp. USA 1994.
- Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1991;29:1439-46.
- Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation of analytical assays. Geneva: WHO, 1997:65-95.
- Broughton PMG, Bergonzi C, Lindstedt G, Loeber IG, Malan PG, Mathieu M, et al. Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use. Part 1. Quantitative tests. European Committee for clinical laboratory Standard, 3;3,1986.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). London: Nuffield laboratories of comparative medicine: 1979:4-44.
- Kuhlmann WD, Rieger J. Diphtheria immunity of a West German population by measurement of antitoxin antibodies with enzyme-linked immunosorbent assay. *Immunol Infect Dis* 1995;5:10-4.
- Papaevangelou G, Karvelis E, Alexiou D, Kiosoglou K, Roumeliotou A, Safary A. Evaluation of a combined tetravalent diphtheria, tetanus, whole cells pertussis and hepatitis B candidate vaccine administered to healthy infants according to a three-dose vaccination schedule. *Vaccine* 1995;13(2):175-8.

Recibido: 16 de marzo de 1998. Aprobado: 15 de noviembre de 1998.  
 Lic. *Xenia Ferriol Marchena*. Instituto "Finlay". Ave 27 No. 19805, AP 16017, La Lisa, La Habana, Cuba. CP 11600.  
 E.mail:inmunoquimica@finlay.edu.cu