

Rev Cubana Med Trop 2005;57(3):

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Validación de un ensayo tipo ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b

[Lic. Gilda Toraño Peraza,¹Lic. Ibis Hernández Vadell,² Lic. Alberto Baly,³ y Dra. María Eugenia Toledo Román⁴](#)

Resumen

Se llevó a cabo el estudio de validación de un ensayo tipo ELISA —aceptado internacionalmente para este propósito—, con el objetivo de disponer de un método para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), en los ensayos clínicos previstos para demostrar la inmunogenicidad de una nueva vacuna conjugada, compuesta por un antígeno sintético. La validación fue conducida en el Laboratorio Nacional de Referencia para *Haemophilus*, en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, La Habana, Cuba, y se diseñó para ello un protocolo en el cual se consideró la determinación de la precisión, exactitud, linealidad y límite de detección del ensayo. En la preparación de la curva patrón estándar se empleó el suero de referencia internacional Hib Lote 1983. Para la repetibilidad y reproducibilidad del sistema se observaron índices de dispersión inferiores a 10 y 20 %, respectivamente. El límite de detección fue de 3,6 ng/ml, y los ensayos de recuperación y linealidad revelaron la alta exactitud del método. Se concluyó que durante la evaluación clínica del candidato a vacuna, obtenido por síntesis química, la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib podía ser afrontada con apropiada precisión y exactitud mediante el método propuesto.

Palabras clave: ELISA, *Haemophilus influenzae* tipo b, precisión, exactitud, linealidad.

El empleo de las primeras vacunas para prevenir las infecciones producidas por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) apuntó hacia la necesidad de desarrollar métodos que permitieran estimar la concentración de anticuerpos contra su polisacárido capsular (PS), aplicables a escalas superiores a las utilizadas hasta ese momento.¹⁻⁶ El método clásico de cuantificación de los anticuerpos anti-PS de Hib es el radioinmunoensayo (RIA), pero su ejecución por parte de los laboratorios que así lo necesiten resulta engorrosa, pues este requiere de la preparación de un antígeno marcado con isótopos radioactivos y necesita de volúmenes mayores de suero para las determinaciones, en comparación con otros métodos.⁷⁻

Los sistemas inmunoenzimáticos constituyen una alternativa útil, con mejores posibilidades de extensión y por tanto mayor aplicabilidad. Hasta el presente son varios los ELISAs descritos para la determinación de anticuerpos anti-PS de Hib, pero no existe consenso internacional para definir la superioridad de un método sobre los otros.¹⁰

El Laboratorio Nacional de Referencia para *Haemophilus* en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), como parte del grupo de investigación vinculado a un Proyecto Nacional para la evaluación clínica de un candidato vacunal cubano contra Hib, obtenido por síntesis química, tuvo a su cargo la determinación de la inmunogenicidad de este.¹¹ Para ello, propuso utilizar un diseño de ELISA indirecto, descrito por *Phipps* y otros en 1990, en el cual los sueros en los que se quiere determinar los anticuerpos anti-PS se añaden sobre placas recubiertas con una preparación antigénica compuesta por una mezcla de fragmentos de varias tallas del oligosacárido de Hib, conjugado con albúmina humana (Ag HbO-HA).^{12,13}

En el presente trabajo se reportaron los resultados de un estudio de validación del ELISA antes mencionado, llevado a cabo con el objetivo de disponer de la herramienta necesaria para la cuantificación de los anticuerpos anti-PS de Hib, durante los ensayos clínicos diseñados para la demostración de la inmunogenicidad del candidato cubano a vacuna.

Métodos

Se siguió el protocolo del ELISA descrito por *Phipps* y otros, con ligeras modificaciones introducidas por otros autores.¹²⁻¹⁴ Brevemente: cada placa es recubierta con una suspensión (1 µg/mL) de Ag HbO-HA (NIBSC, Poters Bar, UK) en tampón fosfato salina (PBS) pH 7-7,4, e incubada toda la noche a 37 ° C. Luego de añadir las diluciones de los sueros en los que se quieren determinar los anticuerpos anti-PS de Hib, los complejos Ag-Ac formados se hacen reaccionar con un conjugado anti-IgG humana peroxidasa. La reacción se revela empleando o-fenildiamina (OPD), y las lecturas de absorbancia se realizan utilizando un filtro de 490 nm. Para el cálculo de las concentraciones se sigue el procedimiento referido por *Plikaytis* y otros en el Manual del Programa ELISA para Windows Versión 1 del CDC (*Center for Disease Control and Prevention*).¹⁵

Suero de referencia: para preparar la curva estándar se empleó el suero humano anti-polisacárido capsular de Hib Lote 1983 (*Center for Biological Evaluation and Review, Food and Drug Administration, Bethesda, Meryland*). Este constituye el suero de referencia internacional para el cual se conoce que la concentración de Ig_s totales anti-PS es de 70 µg/mL (IgG = 60,9 µg/mL, IgM = 3,5 µg/mL, IgA = 5,6 µg/mL).^{12-14,16}

Suero control positivo: en cada placa de ELISA trabajada se incluyó como control positivo un suero con anticuerpos para el PS de Hib, obtenido a partir de un voluntario vacunado durante un ensayo clínico

llevado a cabo en adultos sanos para evaluar la reactogenicidad e inmunogenicidad del candidato vacunal cubano contra Hib.¹¹ Para este suero, fueron calculados previamente en el laboratorio los límites aceptables (inferior y superior) de concentración de IgG ($47,53 \mu\text{g/mL} \leq \text{control positivo} \leq 100,72 \mu\text{g/mL}$).

Sueros problemas: para el estudio de validación que a continuación se describe, se emplearon sueros inmunes de adultos vacunados durante la evaluación clínica antes mencionada, conservados a -70°C . En cada ensayo realizado durante la validación se prepararon las diluciones necesarias de las muestras, en suero fetal bovino (SFB) 10 %, utilizando siempre factor de dilución 5 (1/1 250, 1/6 250, 1/31 250, 1/56 250).

Validación

Como el ELISA a validar pertenece a la categoría en la que se incluyen los métodos que evalúan las características de las formas farmacéuticas (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. 1998), se diseñó un protocolo de validación en el que se propuso el estudio de los parámetros analíticos siguientes: límite de detección, precisión, exactitud y linealidad.

- *Límite de detección* (concentración mínima detectable): se realizaron 80 repeticiones de blanco reactivo (SFB 10 % en PBS) en 3 placas diferentes y se calculó la media de las concentraciones (X), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV). El límite de detección (LD) se calculó a través de la fórmula siguiente: $LD = X + 2DE$.
- *Precisión intraensayo* (repetibilidad): se seleccionaron 3 sueros inmunes de concentración conocida (suero 1: baja, suero 2: media y suero 3: concentración alta). Se prepararon 4 diluciones de cada uno en la forma que ya se describió antes, y de cada dilución se prepararon 10 réplicas. Se procedió con el ELISA bajo las mismas condiciones de operación y por un mismo analista. Para el procesamiento estadístico se calculó la X , la DE y el CV para cada una de las diluciones utilizadas. Se adoptó como criterio de aceptación que la imprecisión intraensayo tuviera un $CV \leq 10 \pm 2,5$ (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. 1998).
- *Precisión interensayo* (precisión intermedia): se seleccionaron 7 sueros inmunes de concentración conocida, de manera que estuvieran representados sueros de baja, media y alta concentración. Se prepararon 4 diluciones de cada uno de los sueros y 10 réplicas de cada dilución. Se procedió con el ELISA en días distintos y por 2 analistas diferentes. Para el procesamiento estadístico se calculó la X , la DE y el CV de cada muestra por día, y el CV interensayo. Se adoptó como criterio de aceptación que este fuera $\leq 20\%$ (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. 1998).
- *Exactitud:* se midió a través del ensayo de recuperación y del ensayo para evaluar el rango de la curva estándar seleccionada (linealidad):

- Recuperación:** se seleccionó una muestra libre de anticuerpos (SFB 10 %) a la cual se añadieron diferentes volúmenes de una muestra de concentración de anticuerpos bien definida, que en este ensayo resultó ser el propio suero de referencia Hib Lote 1983. Para lograr esto, se prepararon 4 diluciones y de cada una se trabajaron 10 réplicas. El porcentaje de recuperación se calculó mediante la fórmula que se describe a continuación, y como criterio de aceptación se adoptó que el valor obtenido debía oscilar entre 80-120 % (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. 1998).

$$\% \text{ de recuperación} = \text{valor obtenido } (\mu\text{g/mL}) / \text{valor teórico } (\mu\text{g/mL}) \times 100$$

donde:
valor obtenido = concentración obtenida al aplicar el ELISA.
- Linealidad:** se calculó el coeficiente de correlación (r) para la curva estándar utilizada en 6 ensayos diferentes, empleando el Programa ELISA para Windows Versión 1 del CDC.¹⁵ Se tomó como criterio que r fuera $\geq 0,98$ (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. 1998).

Resultados

En la tabla 1 se resumen los resultados alcanzados en la determinación del límite de detección del sistema. Como puede observarse, el valor obtenido es bajo (0,0036 $\mu\text{g/mL}$ o 3,6 ng/mL), lo cual significa que la detectabilidad del método es alta.

Tabla 1. Resultados obtenidos durante la determinación del límite de detección en el ELISA de cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b

Placa	X ($\mu\text{g/mL}$)	DE	CV
1	0	0	0
2	0,001	0	0
3	0,010	0	0
X_{Blanco}	0,0036		
LD	0,0036		

X: media de las concentraciones obtenidas en cada placa para el blanco reactivo, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación, LD: límite de detección ($LD = X + 2DE$).

La precisión intraensayo, medida para 3 sueros diferentes, se comportó de forma satisfactoria (tabla 2). Los CV que se obtienen, considerando para cada muestra las 10 réplicas de todas las diluciones, es menor que 10 %, excepto para la dilución 1/250 del suero de concentración media, que produjo un valor de 11,89 %, pero aun así se mantiene dentro del criterio de aceptación. De la misma forma, los CV obtenidos para cada suero, tomando en cuenta la concentración media calculada considerando todas las diluciones, exhiben valores aceptables (suero 1= 7,75 %, suero 2= 10,52 % y suero 3= 7,41 %).

Tabla 2. Resultados de la determinación de la precisión intraensayo en el ELISA de cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b

Suero	Dilución	X	DE	CV %
1	1/50	0,61	0,04	7,96
	1/250	0,55	0,05	9,81
	1/1250	-	-	-
	1/6250	-	-	-
			0,58	0,09
2	1/250	7,10	0,84	11,89
	1/1250	6,49	0,59	9,15
	1/6250	-	-	-
	1/31250	-	-	-
		6,79	1,43	10,52
3	1/1250	-	-	-
	1/6250	-	-	-
	1/31250	631,20	41,46	6,57

1/156250 749,23 60,88 8,12

690,21 102,34 7,41

Sueros 1, 2 y 3: sueros de baja, media y alta concentración, respectivamente; X: media de las concentraciones para cada dilución (10 réplicas por dilución); DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; -: diluciones que produjeron valores de DO fuera del rango de la curva estándar.

En la tabla 3 se recogen los resultados de la determinación de la precisión interensayo. Como puede observarse, el CV para todos los casos fue inferior a 20 %, e incluso fue inferior a 10 % para 4 sueros. Se logró un CV promedio igual a 10,24 %.

Tabla 3. Resultados de la determinación de la precisión interensayo en el ELISA de cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b

Suero	Ensayo 1		Ensayo 2		CV % interensayo
	X	CV	X	CV	
1	2,52	19,5	1,40	10,2	18,3
2	6,41	18,6	3,75	20,3	4,9
3	1,41	20,2	2,13	6,6	15,6
4	55,51	20	39,37	11,9	19,8
5	101,54	17,8	150,32	19,6	5,8
6	190,75	19,3	301,14	15,7	1,8
7	712,56	13,1	693,94	18,7	5,5
CV promedio					10,24

X: media de las concentraciones en cada día que se trabajó el ensayo, CV: coeficiente de variación.

La recuperación del sistema (tabla 4), para el segundo y tercer segmentos de la curva (diluciones 1/6 250 y 1/31 250), se comporta dentro de los valores óptimos (96,3 y 90,4 %). El CV obtenido para ambas concentraciones fue satisfactorio (< 15 %). El primer y cuarto segmentos rindieron valores de DO

ligeramente superiores e inferiores, respectivamente, a los observados para la curva estándar, por lo que no fueron considerados para el cálculo del porcentaje de recuperación.

Tabla 4. Resultados del ensayo de recuperación llevado a cabo utilizando como muestra el suero de referencia Hib lote 1983 en el ELISA de cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b.

Dilución	X	DE	CV	R %	Promedio de recobrado %
1/1250	-	-	-	-	93,35
1/6250	58,67	8,41	14,3	96,3	
1/31250	55,08	7,21	13,09	90,4	
1/156250	-	-	-	-	

X: media de las concentraciones para cada dilución, R %: porcentaje de recuperación, CV: coeficiente de variación, -: diluciones que produjeron valores de DO fuera del rango de la curva estándar.

Por último, en la prueba de linealidad, todos los valores obtenidos para r fueron superiores a 0,98, y se obtuvo como rango mínimo para las DO del estándar: 0,050 – 0,813 (tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la evaluación de la linealidad de la curva estándar en el ELISA de cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b

Ensayo	r	Rango de las diluciones del estándar	Rango de las DO del estándar
1	0,9998	156 250 – 1 250	0,050-0,813
2	0,9946		0,122-1,165
3	0,9957		0,062-1,323
4	0,9994		0,061-1,028
5	0,9989		0,088-1,151
6	0,9964		0,131-1,473

r: coeficiente de correlación, DO: densidad óptica.

Discusión

La validación de un ensayo analítico es el proceso a través del cual se establecen los parámetros apropiados para este de: exactitud, precisión, linealidad, límites de detección y especificidad, entre otros. Dependiendo del tipo de método de que se trate (físico-químico o biológico) se definen criterios de aceptación para cada uno de estos parámetros, que deben ser demostrados y documentados (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. 1998).

La prueba desarrollada para establecer el límite de detección del sistema (tabla 1) reveló un valor satisfactorio (3,6 ng/mL). El límite de detección es la mínima cantidad (diferente de cero) de un analito detectable por un método, pero que no necesariamente puede ser cuantificada como concentración o cantidad (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. 1998). De acuerdo con este concepto, el resultado obtenido es adecuado, pues para Hib se reporta como concentración mínima de anticuerpos protectores el valor de 0,15 µg/mL.^{17,18}

En el período en que solo estaban disponibles vacunas constituidas únicamente por el PS de Hib como inmunógeno, concentraciones > 0,15 µg/mL fueron consideradas como protectoras para un período inmediato a la vacunación y por un corto tiempo; mientras que títulos > 1 µg/mL se han relacionado con protección duradera. Con la disponibilidad actual de vacunas conjugadas, capaces de estimular concentraciones más altas de anticuerpos, estos valores son probablemente irrelevantes, pero aún se refieren cuando se describe respuesta inmune durante estudios clínicos de vacunas.¹⁹

Los experimentos de precisión intraensayo y precisión interensayo mostraron resultados que se comportan dentro de los criterios óptimos adoptados (tablas 2 y 3). Se define como precisión a la dispersión de los resultados obtenidos para una muestra procesada varias veces por un ensayo, y puede ser medida de diferentes formas, siempre utilizando un mínimo de 5 determinaciones (réplicas) por concentración (diluciones). En este estudio se determinó la precisión intraensayo o también llamada repetibilidad, que determina el CV de una misma muestra para concentraciones que se correspondan con varias puntos de la curva estándar, durante un mismo ensayo (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. 1998). Los CV logrados para las 3 muestras trabajadas cumplen con el criterio de aceptación, por lo que puede calificarse de buena la precisión que alcanza el método.

También en este estudio se calculó la precisión interensayo, que se refiere a la precisión, expresada en función del CV, la cual se logra al procesar varias diluciones de una misma muestra pero en diferentes ensayos (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug

Evaluation and Research. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. 1998). En este caso se trabajaron un número mayor de muestras que en el ensayo anterior, y de acuerdo con los resultados obtenidos puede afirmarse que el método también cumple con los criterios de una precisión interensayo satisfactoria.

Por otra parte, la recuperación del sistema se ubicó entre 96,3 y 90,4 %, y el valor promedio del recobrado fue de 93,35 %. Se conoce por recuperación de un método analítico al sesgo o porcentaje de error entre el valor de la concentración observado para una muestra y el valor real de concentración de esta. Frecuentemente, su determinación no es posible para productos biológicos, pues no siempre se dispone de un estándar de referencia puro. En este estudio se optó por la utilización del propio suero de referencia internacional Hib Lote 1983 para el cual se conoce que la concentración de IgG es de 60,9 µg/mL. Como se puede observar en la tabla 4, para el segundo y tercer segmentos de la curva se obtienen concentraciones para este suero de: 58,67 y 55,08 µg/mL, respectivamente, que se corresponden con los porcentajes de recuperación citados antes. Estos resultados evidencian la alta exactitud del sistema.

El análisis de la linealidad por su parte, mostró que la curva estándar es capaz de producir valores para r en el rango establecido como criterio de aceptación. La linealidad es la capacidad de un ensayo para ofrecer resultados directamente proporcionales a la concentración de un analito en la muestra. La determinación de este parámetro identifica el alcance del ensayo, es decir, da una medida de la concentración más alta y más baja que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. 1998). En cada placa de ELISA trabajada se incluye una curva estándar, y solo serán útiles aquellas en las que el valor para r sea $\geq 0,98$. De la misma manera las muestras trabajadas en cada placa necesitarán ser repetidas cuando los valores de DO obtenidos estén por debajo o por encima del rango de DO obtenido para el estándar.

En resumen, atendiendo a los resultados de cada uno de los procedimientos incluidos en el protocolo de validación utilizado, quedó demostrado que el método es confiable para la aplicación propuesta. El diseño de ELISA sugerido, empleado por otros autores en anteriores evaluaciones clínicas de candidatos a vacuna,^{14,16,17,18,20} mostró apropiada precisión y exactitud, por lo que es útil para ser usado en la evaluación de la inmunogenicidad del candidato vacunal cubano contra Hib en las condiciones del Laboratorio Nacional de Referencia para *Haemophilus* en el IPK.

Validation of an ELISA assay for the quantification of antibodies against *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide

Summary

The validation study of an ELISA assay – internationally accepted for this purpose – was conducted

aimed at having a method for the quantification of antibodies against *Haemophilus influenzae* type b (Hib) capsular polysaccharide in the clinical trials used to prove the immunogenicity of a new conjugated vaccine composed of a synthetic antigen. The validation was carried out in the National *Haemophilus* Reference Laboratory, in “Pedro Kouri” Institute of Tropical Medicine, Havana, Cuba. A protocol was designed, in which the determination of accuracy, exactness, linearity and limit of the detection of the assay were considered. The Hib Batch 1983 international reference serum was used in the preparation of the standard pattern curve. Dispersion indexes lower than 10 and 20 % were observed for the repeatability and reproducibility of the system, respectively. The limit of detection was 3.6 ng/m and the recovery and linearity trials showed the high accuracy of the method. It was concluded that during the clinical evaluation of the candidate vaccine obtained by chemical synthesis, the quantification of antibodies against Hib capsular polysaccharide may be faced with an appropriate precision and exactness by using the proposed method.

Key words: ELISA, tipo b *Haemophilus influenzae*, accuracy, exactness, linearity.

Referencias bibliográficas

1. Johnston R, Anderson P, Rosen F, Smith D. Characterization of human antibody to polyribophosphate, the capsular antigen of *Haemophilus influenzae* type b. *Clin Immunol Immunopathol* 1973;1:234-40.
2. Robbins J, Parke J, Schneerson, Whisnant J. Quantitative measurement of “natural” and immunization-induced *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibodies. *Pediatr Res* 1973;7:103-10.
3. Smith D, Peter G, Ingram D, Harding, Anderson P. Responses of children immunized with the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatrics* 1973;52:637-44.
4. O’Reilly R, Anderson P, Ingram D, Peter G, Smith D. Circulating polyribophosphate in *Haemophilus influenzae* type b meningitis. Correlation with clinical course and antibody response. *J Clin Invest* 1975;56:1012-22.
5. Peltola H, Kayhty H, Sivonen A, Makela H. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double-blind field study of 100 000 vaccinees 3 months to 5 years of age in Finland. *Pediatrics* 1977;60:730-7.
6. Madore D, Anderson P, Baxter B, Carlone G, Edwards K, Hamilton R. Interlaboratory study evaluating quantitation of antibodies *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin Diagnostic Lab Immunol* 1996;3:84-8.
7. Edwards K, Decker M, Palmer P, Porch C, Sell S, Wright P. Lack of comparability between commonly uses serological assays of immune response to *Haemophilus influenzae* vaccine. *J Infect Dis* 1987;155:283-91.
8. Farr R. A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I*BSA and antibody. *J Infect Dis* 1958;103:239-62.
9. Ward J, Greenberg D, Anderson P, Burkart K, Christenson P, Gordon L, et al. Variable quantitation of *Haemophilus influenzae* type b anticapsular antibody by radioantigen binding assay. *J Clin Microbiol* 1988;26:72-8.
10. Makela P, Eskola J, Kayhty H, Takala A. Vaccines against *Haemophilus influenzae* type b. *En*

- Molecular and Clinical Aspects of Bacterial Vaccine Development. Ala'Aldeen A and Hormaeche C eds. John Wiley & Sons Ltd.; 1995, p.42-91.
11. Verez V, Fernández V, Hardy E, Toledo M, Rodríguez MC, Heynngnezz L et al. A Synthetic Conjugate Polysaccharide Vaccine Against *Haemophilus influenzae* Type b. *Science* 2004;305:522-5.
 12. Phipps DC, West J, Eby R, Madore DV, Quataert SA. An ELISA employing a *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide-human serum albumin conjugate correlates with the radioantigen binding assay. *J Immunol Methods* 1990;135:121-8.
 13. Madore DV, Quataert SA. Interlaboratory reproducibility of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies for *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide. *Clin Diagnostic Lab Immunol* 1999;6:446.
 14. Nicol M, Huebner R, Mothupi R, Kayhty H, Mbelle N, Khomo E. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine diluted tenfold in diphtheria-tetanus-whole cell pertussis vaccine: a randomized trial. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:138-41.
 15. Plikaytis B, Holder P, Carlone G. Program ELISA for Windows User's Manual, Version 1.00. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention;1996.
 16. Kayhty H, Eskola J, Peltola H, Stout M, Samuelson J, Gordon L. Immunogenicity in infants of a vaccine composed of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide mixed with DPT or conjugated to diphtheria toxoid. *J Infect Dis* 1987;155:100-6.
 17. Anderson P. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1984;149:1034.
 18. Kayhty H, Makela P. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1984;149:1034-5.
 19. Wegner J, Heath P. Epidemiological impact of conjugated vaccines on invasive disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. En *Newer Generation Vaccines*. Levine M, Woodrow G, Kape J eds. Marcel Dekker Inc.; 1999, p.489-502.
 20. Clemens S, Azevedo T, Homma A. Feasibility study of the immunogenicity and safety of a novel DTPw/Hib (PRP-T) Brazilian combination compared to a licensed vaccine in healthy children at 2, 4, and 6 months of age. *Rev Soc Bras Med* 2003;36(3).

Recibido: 17 de junio de 2005. Aprobado: 13 de septiembre de 2005.

Lic. *Gilda Toriño Peraza*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", AP 601, CP 11300, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: gilda@ipk.sld.cu

¹[Máster en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar. Profesora Instructora.-](#)

²[Máster en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología. Aspirante a Investigadora.-](#)

³[Máster en Artes Económicas. Licenciado en Matemáticas. Investigador Agregado.-](#)

⁴[Máster en Epidemiología. Doctora en Medicina. Especialista de I Grado en Medicina General Integral.](#)

