



CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
ARTÍCULO ORIGINAL

## Validación de un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA para cuantificar niveles de antitoxina diftérica en suero humano

### Validation of an ELISA-type immune-enzymatic test to quantify levels of diphtheria antitoxin in human serum

Cira Virgen Rodríguez Pelier<sup>1</sup>, Yaíma Zúñiga Rosales<sup>1\*</sup>, Bárbara Torres Rives<sup>1</sup>,  
Minerva Matarán Valdés<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [yaimazuniga@infomed.sld.cu](mailto:yaimazuniga@infomed.sld.cu)

#### Cómo citar este artículo

Rodríguez Pelier CV, Zúñiga Rosales Y, Torres Rives B, Matarán Valdés M. Validación de un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA para cuantificar niveles de antitoxina diftérica en suero humano. Rev haban cienc méd [Internet]. 2018 [citado ]; 17(4):527-539. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2113>

Recibido: 29 de agosto del 2017.

Aprobado: 28 de mayo del 2018.

#### RESUMEN

**Introducción:** La difteria aún persiste en numerosos países. En Cuba, estudios realizados en diferentes grupos etarios han demostrado que existen niveles no protectores de antitoxina diftérica en la población, por lo que es necesario contar con métodos que permitan la estimación serológica de la inmunidad poblacional. La cuantificación de anticuerpos contra antígenos vacunales como la toxina diftérica es además un

método útil, rápido y económico para evaluar la respuesta inmune.

**Objetivo:** Validar un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA para cuantificar los niveles de antitoxina diftérica en suero humano.

**Material y Método:** Se realizó un estudio experimental de desarrollo tecnológico, en el cual se determinaron los valores óptimos de las variables que influyen en el resultado de un

ensayo inmunoenzimático heterogéneo indirecto para la cuantificación de antitoxina diftérica, desarrollado en el laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Genética Médica de Cuba. La curva de calibración se evaluó contra el estándar de la OMS (Diphtheria Antitoxin Human Serum 00/496). Se realizó la validación analítica del método estandarizado.

**Resultados:** Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron inferiores a 10% y 20%, respectivamente. En la exactitud y selectividad se encontraron valores de recobrado entre 90 y 110%. El paralelismo entre la curva

estándar y las muestras estudiadas presentó un coeficiente de variación menor o igual a 10%. El límite de cuantificación fue 0,015 UI/mL y el de detección 0,0039 UI/mL.

**Conclusiones:** El resultado obtenido en la precisión, exactitud y selectividad del ensayo inmunoenzimático tipo ELISA desarrollado demostró que puede ser utilizado en la práctica clínica para cuantificar los valores de antitoxina diftérica en suero humano.

**Palabras claves:** Antitoxina diftérica, ensayo inmunoenzimático, ELISA, validación.

#### ABSTRACT

**Introduction:** Diphtheria still persists in many countries. In Cuba, studies conducted in different age groups have demonstrated that there are non-protective levels of diphtheria antitoxin in the population, so it is necessary to have methods that allow the serologic survey of population immunity. The quantification of antibodies against vaccine antigens such as diphtheria toxin is also a useful, rapid and economic method to evaluate the immune response.

**Objective:** To validate an ELISA-type immune-enzymatic test to quantify the levels of diphtheria antitoxin in human serum.

**Material and Method:** An experimental study of technological development was carried out in the Immunology Laboratory of the National Medical Genetics Center, Havana, Cuba. The optimal values of the variables that influence on the result of the indirect heterogeneous immune-

enzymatic test for the quantification of diphtheria antitoxin were determined. The calibration curve obtained was evaluated against the WHO standard (Diphtheria Antitoxin Human Serum 00/496). The analytical validation of the standardized method was performed.

**Results:** The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were less than 10% and 20%, respectively. Recovery values between 90 and 110% were found in accuracy and selectivity. The parallelism between the standard curve and the samples studied showed a coefficient of variation lower or equal to 10%. The limit of quantification was 0,015 IU/mL and the one of detection was 0,0039 IU/mL.

**Conclusions:** The result obtained in the precision, accuracy and selectivity of the ELISA-type immune-enzymatic test developed and validated in the National Medical Genetics Center demonstrated that it can be used in the clinical

practice to quantify the values of diphtheria antitoxin in human serum.

### INTRODUCCIÓN

La difteria es una enfermedad trasmisible, caracterizada por manifestaciones locales en las vías respiratorias y sistémicas, causada por la toxina diftérica, producida por el agente patógeno *Corynebacterium diphtheriae*.<sup>(1)</sup> La difteria aún persiste en numerosos países y varios brotes epidémicos han tenido lugar en los últimos 10 años, afecta principalmente a los adultos que han perdido la inmunidad inducida por vacunas, y a los niños no inmunizados.<sup>(1)</sup> La brecha de la inmunidad en los adultos y la presencia de un gran número de niños y adolescentes susceptibles, ha creado las bases para estas epidemias.<sup>(2)</sup> En 2014, fueron reportados a nivel mundial 7 321 casos de difteria a la Organización Mundial de la Salud (OMS), pero muchos casos más probablemente no se reportan.<sup>(3)</sup>

En América, aunque se ha aplicado el programa ampliado de inmunización de la OMS y se ha logrado una sostenida disminución de la incidencia, todavía hay países como Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Haití, Paraguay y República Dominicana que presentan la enfermedad de forma endémica, presentan brotes en algunos de ellos en los últimos años.<sup>(3)</sup>

En los países industrializados, los altos niveles de inmunización en niños han provocado la disminución de la circulación del *Corynebacterium diphtheriae*, por lo que hay menos posibilidades de reforzar la inmunidad por exposición natural; aparecen grupos de individuos adultos no inmunes con condiciones ideales para brotes epidémicos.<sup>(1)</sup>

**Keywords:** diphtheria antitoxin, immune-enzymatic test, ELISA, validation.

En Cuba, la cobertura de vacunación contra la difteria se elevó a 90% a inicios de la década de los años 70, y como consecuencia esta desapareció en 1979. Sin embargo, los resultados obtenidos en estudios realizados a diferentes grupos etarios que demuestran niveles no protectores de antitoxina diftérica en la población cubana, unido a la reemergencia de la difteria en varios países son causa de preocupación ante la posibilidad de ocurrencia de brotes.<sup>(1,4,5,6,7)</sup>

Adicionalmente la disponibilidad de métodos que permitan cuantificar anticuerpos contra antígenos vacunales como el toxoide tetánico o diftérico se emplea en la práctica clínica para evaluar la competencia del sistema inmune, y contribuye al diagnóstico de inmunodeficiencias. La determinación de anticuerpos antitoxina diftérica tradicionalmente, se ha realizado por métodos *in vivo* como los ensayos de neutralización de toxinas en conejillos de indias o conejos. Los métodos *in vivo* y los procedimientos *in vitro* tales como la hemoaglutinación pasiva y las pruebas de neutralización en cultivo de tejidos tienen la desventaja de ser complejos de manipular y estandarizar, además de ser lentos y costosos. Sin embargo, el empleo de ensayos inmunoenzimáticos como el análisis de inmunoadsorción ligado a enzima o ELISA (del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en la práctica de laboratorio de rutina ofrece ventajas por su elevada sensibilidad,

detectabilidad y especificidad, además de ser un procedimiento técnico rápido, sencillo,

económico y que permite evaluar un elevado número de muestras al unísono.<sup>(1,5)</sup>

### OBJETIVO

Validar un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA para cuantificar niveles de antitoxina diftérica en suero humano.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental de desarrollo tecnológico, dirigido a la validación de un ensayo inmunoenzimático heterogéneo indirecto para la cuantificación de antitoxina diftérica, desarrollado en el laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), La Habana, Cuba.

Se determinaron los valores óptimos de un grupo de variables que influyen en el resultado del ensayo inmunoenzimático y para su validación se siguieron los procedimientos que se establecen por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) del Ministerio de Salud Pública (MINSAP) de Cuba en las regulaciones 41 de 2007 y 40 de 2014.<sup>(8)</sup>

La ejecución de este proyecto fue aprobada por el Comité de Ética y el Consejo Científico del Centro Nacional de Genética Médica y para el desarrollo del estudio se tuvieron en cuenta los principios enunciados en la última actualización de la declaración de Helsinki.<sup>(9)</sup> A los pacientes que participaron en el estudio se les explicó los aspectos de interés de la investigación y una vez que dieron su consentimiento verbal, se les entregó el modelo del consentimiento informado para su firma.

#### *Antígeno*

Como antígeno de captura para la estandarización se utilizó la anatoxina diftérica

producida y purificada por el Instituto Finlay (La Habana, Cuba).<sup>(10)</sup>

#### *Estándar y controles 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>(11,12)</sup>

El suero seleccionado para la curva de calibración fue evaluado contra el estándar de la OMS (Diphtheria Antitoxin Human Serum 00/496). 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<sup>2</sup>) mayor de 0,98.<sup>(11,13)</sup>

Para evaluar la curva de calibración se realizó un análisis de regresión lineal entre el estándar de referencia y el preparado en el laboratorio, se hicieron diluciones dobles seriadas desde 1/100 hasta 1/3200 para ambos estándares.

Para el control positivo se utilizaron sueros de alta, media y baja concentraciones de antitoxina tetánica, determinadas por cuantificación mediante el método comercial VaccZyme™ Diphtheria Toxoid IgG Enzyme Immuno Assay de

Binding Site que cubrieron el rango de trabajo de la curva de calibración.<sup>(11,13)</sup> Se comprobó la distribución normal según la prueba de Kolmogorov Smirnov.

#### *Procedimiento*

Se sensibilizaron placas de 96 pocillos (DELTALAB) durante una hora a 37°C en cámara húmeda con toxoide diftérico a 8LF/mL (LF: unidades de floculación) diluido en amortiguador carbonato bicarbonato de sodio 0,05 M, pH 9,6. La dilución utilizada para las muestras fue 1/20 y el conjugado anti-IgG humana peroxidasa (DAKO) desde 1/6000 hasta 1/14000, ambos se diluyeron en buffer fosfato salino más Tween 20 al 0,05% más leche desnatada al 4% (PBS-T+LD 4%). El material no adsorbido después de cada paso se eliminó al lavar la placa tres veces con 250 µl por pocillo de PBS-T pH 7,2. La lectura de las densidades ópticas se realizó a 942 nm y se transformaron a unidades de concentración mediante el programa computacional *ELISA for Windows*, del Centro para Enfermedades Infecciosas (CDC) de Atlanta, USA, que utiliza una función logistic-log de cuatro parámetros y el método robusto de mínimos cuadrados para el ajuste de la curva de calibración.<sup>(4,11)</sup> El análisis estadístico se realizó con el paquete de herramientas Microsoft Office Excel 2007 y los programas Statgraphics Plus 5.0 y Statistical.

#### **Parámetros de Validación**

##### *Precisión intraensayo*

La variabilidad intrínseca del ELISA se determinó mediante la precisión intraensayo. Se seleccionaron seis muestras de sueros con concentraciones conocidas de anticuerpos contra toxina diftérica dentro del rango analítico, incluyendo muestras con concentraciones

inferiores y superiores a 0,1 UI/mL, valor considerado como protección adecuada cuando es determinada mediante ELISA y se evaluaron por triplicado en tres ensayos; se realizaron nueve replicados de cada muestra. Se determinaron el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV). Este último parámetro estadístico no debía superar 10% para considerarse la precisión intraensayo como adecuada.<sup>(13,14,15)</sup>

##### *Precisión interensayo*

Para su determinación se seleccionaron seis sueros de diferentes concentraciones y se evaluaron por triplicado bajo tres condiciones diferentes: tres analistas un mismo día, un mismo analista mediante ensayos en paralelo y en días diferentes. Para la precisión tanto intraensayo como la precisión interensayo se calculó el CV mediante la fórmula:  $CV = (\text{Desviación estándar (DE)} / \text{Concentración Promedio}) \times 100$ . El CV no debe superar 20% en la interensayo, para considerarse que la precisión es adecuada.<sup>(13,14,15)</sup>

##### *Exactitud*

La exactitud se determinó mediante ensayo de recuperación. Se prepararon cuatro muestras a partir del suero estándar de la OMS de concentración conocida y se evaluaron por triplicado. El porcentaje de recuperación se determinó por la siguiente fórmula:  $R = \text{valor obtenido} / \text{valor esperado} \times 100$ . Se tomó como criterio de aceptación que R estuviera dentro del intervalo de 90 a 110%.<sup>(13,14,15,16)</sup> Se utilizó la Prueba t para muestras pareadas para determinar la diferencia entre el valor esperado y el obtenido, con un nivel de significación de 0,05.

##### *Especificidad*

Para la determinación de la especificidad del

ELISA se utilizó el método de adición al patrón, añadiendo al suero patrón sustancias como triglicéridos, colesterol, inmunoglobulinas y suero hemolítico que pueden estar presentes en el suero del paciente; se evaluaron por triplicado y se analizaron mediante el método de recuperación (R). Para una especificidad aceptable se consideró que R estuviera dentro del intervalo de 90 a 110%.<sup>(13,15,16)</sup>

#### *Linealidad*

Se evaluó mediante el ensayo de paralelismo, para el cual se evaluaron en una misma determinación por triplicado tres muestras y el suero patrón. Se realizaron diluciones dobles seriadas. Para determinar el paralelismo se usó el CV de las concentraciones de las muestras corregidas por el factor de dilución. Se consideraron óptimos los valores de CV inferiores a 10%.

#### *Límite de detección*

Se procesaron 55 muestras del control negativo. Se comprobó la normalidad de la distribución y se le sumó al promedio (X) de las densidades ópticas (DO) dos DE (XDO+2DE).

#### *Límite de cuantificación*

## **RESULTADOS**

Los sueros controles preparados para la verificación de la calidad de la curva de calibración abarcaron la zona central de la curva en un rango de 0,28 UI/ml hasta 0,53 UI/ml, teniendo en cuenta una dilución inicial para las muestras de 1/20. Todos presentaron una distribución normal según la prueba de Kolmogorov Smirnov.<sup>(13,15,16)</sup>

El procedimiento de clarificación, preservación y estabilización con albúmina sérica humana a 6%

Se tomó el valor de concentración inferior del rango de cuantificación mínimo de la curva patrón.

#### *Ensayo de comparación de métodos*

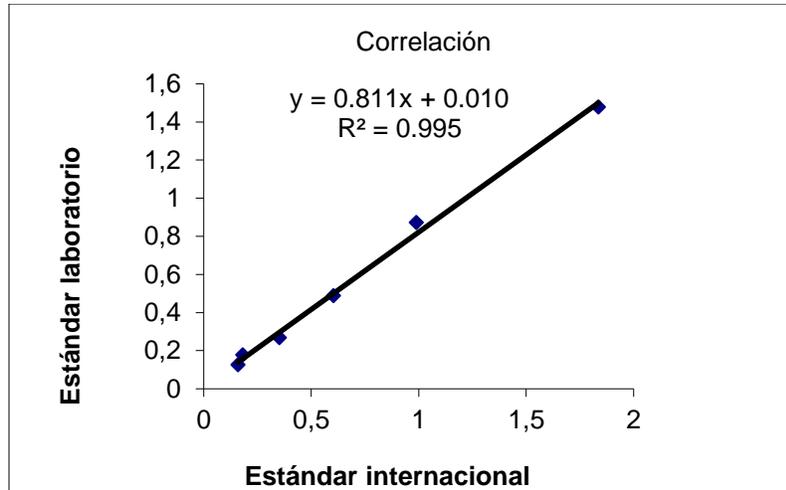
Se realizó la cuantificación del nivel de antitoxina diftérica a 62 muestras mediante el ELISA en validación y un método de referencia con características similares al desarrollado. El ensayo comercial empleado fue VaccZyme™ Diphtheria Toxoid IgG Enzyme Immunoassay fabricado por Binding Site, ELISA indirecto para cuantificar anticuerpos IgG contra el toxoide diftérico. Para comprobar si los resultados obtenidos por ambos métodos eran similares se compararon las medias de cada determinación al utilizar la Prueba t para muestras pareadas ( $\alpha=0,05$ ) y se realizó la recta de regresión entre los valores de concentración determinados por ambos ELISA.

Se evaluó la correlación entre los métodos tanto en muestras con niveles no adecuados de protección o de corta duración ( $<0,1$  UI/mL), como con niveles de protección adecuada o de larga duración ( $\geq 0,1$  UI/mL).<sup>(1,4,5,14)</sup>

en una relación peso/volumen (p/v) permitió que el suero estándar alcanzara una alta estabilidad en condiciones de uso.<sup>(8,12)</sup>

#### *Evaluación de la curva de calibración*

En el análisis de regresión lineal entre el estándar de referencia y el preparado en el laboratorio (Figura 1), se alcanzó una adecuada correlación entre los resultados de concentración de antitoxina diftérica evaluados con ambos estándares.<sup>(17)</sup>



**Figura 1.** Correlación lineal entre los valores de concentración de antitoxina diftérica del estándar del laboratorio y el estándar internacional Diphtheria Antitoxin Human Serum 00/496 (OMS)

**Indicadores de validación**

**Precisión**

La variación intraensayo entre los replicados realizados en las muestras evaluadas en las diferentes determinaciones no superó 10%

(Tabla 1). El ensayo es reproducible con CV intra e interensayo de alrededor de 10% y 20%, respectivamente.<sup>(13,15,16,17)</sup>

**Tabla 1.** Precisión del ELISA para la cuantificación de antitoxina diftérica

Muestras	Precisión intraensayo						Precisión interensayo	
	Determinación 1		Determinación 2		Determinación 3		Total	
	X (UI/mL)	CV (%)	X (UI/mL)	CV (%)	X (UI/mL)	CV (%)	X (UI/mL)	CV %
1	1,77	2,25	1,83	6,33	1,69	10,27	1,76	3,92
2	1,25	3,99	1,11	1,45	0,86	0,24	1,07	18,06
3	0,89	3,32	0,74	5,80	0,67	2,83	0,77	14,67
4	0,43	7,06	0,31	1,93	0,36	3,79	0,36	16,04
5	0,22	2,47	0,16	9,87	0,21	0,98	0,20	16,31
6	0,12	5,30	0,10	2,25	0,11	1,34	0,11	11,38

**X:** media de la concentración de antitoxina diftérica de los tres replicados realizados a cada muestra en los diferentes ensayos.

**CV:** coeficiente de variación.

**Especificidad**

Como se observa en la Tabla 2, después de la adición de sustancias de interferencia al suero

patrón los valores de recuperación de antitoxina diftérica que se alcanzaron estuvieron entre 90 y

110%, valores establecidos como aceptables para una buena especificidad en ensayos inmunoenzimáticos, lo que demuestra que ninguna de las sustancias que normalmente

pueden estar presentes en la muestra interfieren en la capacidad del ensayo para detectar el analito.<sup>(13,15,16,17)</sup>

**Tabla 2.** Especificidad del ELISA para la cuantificación de antitoxina diftérica

Muestras	Densidad óptica			Concentración de antitoxina diftérica (UI/mL)	R (%)
	X	DS	CV		
Suero Patrón	2,58	0,115	4,475	0,099	100
SP + Triglicéridos	2,895	0,091	3,166	0,098	98,99
SP + Colesterol	2,708	0,243	8,977	0,109	110,1
SP + Inmunoglobulina IgG	2,895	0,182	6,303	0,093	93,939
SP + Muestra hemolítica	2,083	0,199	9,569	0,101	102,02

**X:** promedio de las densidades ópticas de los replicados de las muestras

**DS:** desviación estándar

**CV:** coeficiente de variación

**UI/mL:** Unidades internacionales de concentración de antitoxina diftérica por mililitro

**R:** por ciento de recuperación de la concentración de antitoxina diftérica

**SP:** suero patrón

**Exactitud**

Los valores de recuperación que se alcanzaron estuvieron entre 90 y 110%, con un promedio de 103,9% (Tabla 3); se demostró la capacidad del método para dar resultados lo más próximo posible al verdadero valor. El análisis de los datos

por la Prueba t para muestras pareadas permitió considerar con un nivel de confianza de 95% que no existieron diferencias significativas ( $p=0,3425$ ) entre los valores obtenidos y esperados.

**Tabla 3.** Exactitud del ELISA para la cuantificación de antitoxina diftérica

Muestras	Valor esperado UI/mL	Valor obtenido UI/mL	Recuperación %
1	0,1252	0,1283	102,5
2	0,2493	0,2522	98,85
3	0,136	0,1433	105,4
4	0,5173	0,5638	109

**Valor esperado:** concentración conocida de antitoxina diftérica.

**Valor obtenido:** concentración de antitoxina diftérica mediante el ELISA desarrollado

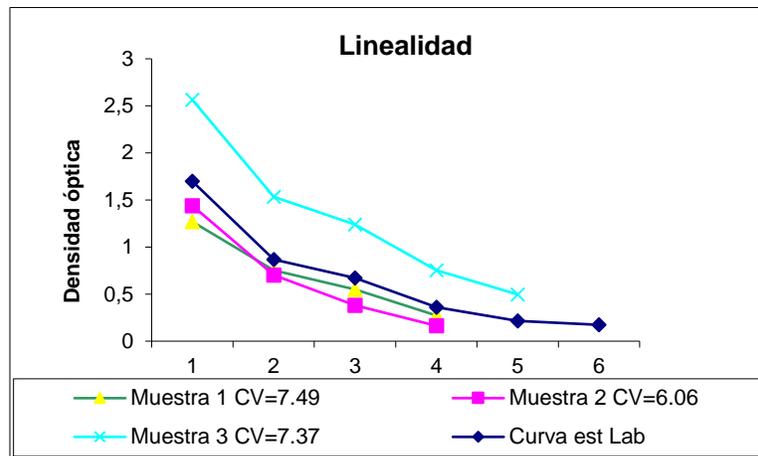
**Promedio de recuperación:** 103,9%

**Prueba t para muestras pareadas,**  $p=0,3425$

**Linealidad**

Los resultados del ensayo de paralelismo mostraron que el suero patrón y las muestras presentaron un comportamiento similar (Figura 2). Una vez que se corrigieron las concentraciones de las muestras al multiplicar

sus valores experimentales por el factor de dilución, el CV fue inferior a 10%, y se demostró que la dilución de las muestras no afectó el resultado final.



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

**Límite de detección**

La concentración mínima detectable que generó una respuesta consistentemente mayor que el valor de fondo del ensayo fue 0,0039 UI/mL, determinada después de ensayar el reactivo blanco con 55 réplicas.

**Límite de cuantificación**

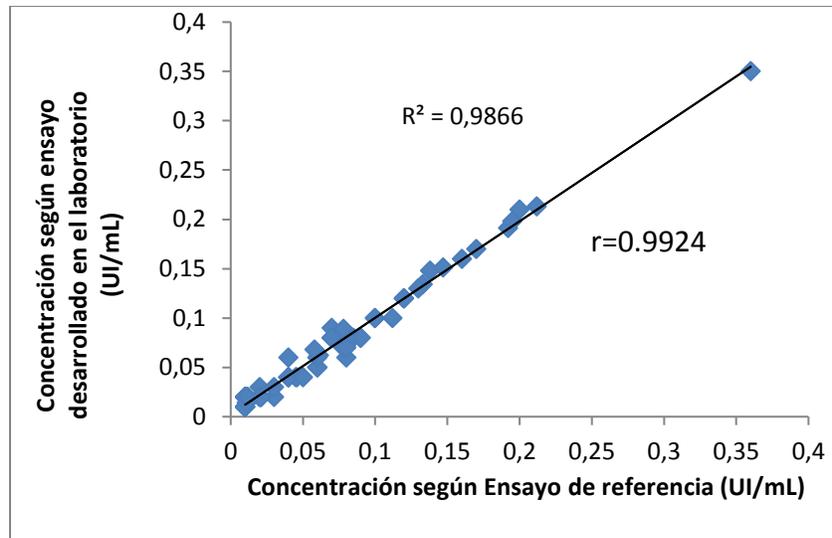
El valor de concentración inferior al valor mínimo de concentración de la curva patrón que fue detectado con una adecuada exactitud y precisión fue 0,015 UI/mL.

**Ensayo de comparación de métodos**

Al realizar la Prueba t para muestras pareadas no se encontraron diferencias significativas entre las medias de concentración de antitoxina diftérica obtenidas con el ELISA desarrollado (1,335

UI/mL) y las obtenidas por el método de referencia (1,287 UI/mL) en las 62 muestras estudiadas, lo que permitió considerar con un nivel de confianza de 95% que no existieron diferencias significativas ( $p=0,8785$ ) entre los valores logrados por ambos métodos.

El análisis de correlación (Figura 3) mostró buena medida de ajuste de los resultados alcanzados por ambos métodos. Sin embargo, los resultados obtenidos en el grupo con niveles no adecuados de protección ( $<0,1$  UI/mL) presentaron menor correlación ( $r=0,91$ ) con el ensayo de referencia, que los del grupo con protección adecuada ( $>0,1$  UI/mL) que presentó  $r =0,99$  y  $R^2 =0,9866$ .



**Figura 3.** Correlación entre los resultados de concentración de antitoxina diftérica determinada por ensayo de referencia y el ensayo desarrollado en el laboratorio

### DISCUSIÓN

La determinación exacta de la antitoxina diftérica es de gran valor para determinar las tasas de inmunidad dentro de la población o el estado inmunológico de individuos que pueden estar en riesgo de infección, por lo que los métodos a utilizar para ello deben cumplir de forma adecuada con los parámetros de calidad establecidos por las normas regulatorias.

En la curva de calibración es imprescindible que la señal analítica utilizada mantenga una relación proporcional con la concentración.<sup>(15,16)</sup> La curva estándar preparada durante la normalización de la técnica mostró una correcta correlación ( $R^2=0,99$ ) al ser evaluada contra el estándar de referencia (Figura 1). Permitió cuantificar muestras cuyas concentraciones oscilan entre 0,015 y 0,33 UI/mL en una dilución de la muestra de 1/20. La prueba de paralelismo de las muestras ensayadas (Figura 2) mostró el CV por debajo de 10%, por lo que se puede afirmar que la curva es confiable en todos los puntos

evaluados, lo cual demuestra la linealidad de la relación dosis respuesta en el rango de trabajo seleccionado.<sup>(13,15,16,17)</sup>

En el análisis de la precisión, los coeficientes de variación intraensayo no sobrepasaron 10%, y los interensayos se mantuvieron por debajo de 20% (Tabla 1), lo cual garantizó una adecuada precisión en la determinación de concentraciones de muestras en diferentes zonas de la curva estándar.<sup>(13,15,16,17)</sup>

La concentración relativa de los anticuerpos con respecto a otras sustancias incorporadas en el medio no influyó en los resultados. Como se observa en el ensayo de recuperación, el ELISA desarrollado fue capaz de discriminar entre las muestras positivas de antitoxina diftérica y otras sustancias interferentes que se adicionaron al suero (Tabla 2).<sup>(13,15,16,17)</sup>

La exactitud indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximo posible al valor verdadero. El recobrado obtenido

durante la validación del método normalizado para cuatro muestras diferentes se ubicó desde 98 a 109% (Tabla 3), lo que demuestra la alta exactitud obtenida al encontrarse todos los valores en el intervalo comprendido por  $\pm 10\%$  del valor esperado.<sup>(13,15,16,17)</sup>

Cuando se compara un método que está siendo validado con uno de referencia usando una recta de regresión, si los dos métodos llevan a resultados idénticos, es obvio que la pendiente debe ser igual a la unidad. La discriminación de muestras con valores de antitoxina diftérica considerados protectores ( $>0,1$  UI/mL) y no protectores ( $<0,1$  UI/mL) fue adecuada con ambos métodos. Aunque en las muestras con concentraciones por debajo del nivel considerado protector determinado mediante ELISA ( $<0,1$  UI/mL) la correlación fue menor ( $r=0,91$ ), la correlación en general fue buena ( $r =0,9924$ ) (Figura 3), con un coeficiente de determinación de la pendiente de la recta mayor de  $0,98$ <sup>(4,5)</sup> ( $R^2=0,986$ ), lo que garantiza que mediante el método desarrollado es posible cuantificar con adecuada exactitud y precisión muestras con concentraciones desde  $0,015$  UI/mL. En las muestras con niveles protectores, la correlación entre ambos métodos fue muy buena.

Aunque el principio de ambos métodos es similar, los materiales y reactivos empleados difieren, por

### CONCLUSIONES

La adecuada precisión, exactitud, especificidad y linealidad del ensayo inmunoenzimático tipo ELISA desarrollado en el laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Genética

lo que la menor correlación entre los resultados de las muestras con concentración de antitoxina diftérica por debajo de  $0,1$  UI/mL puede deberse a estas diferencias. Uno de los posibles factores que influye en estos resultados podría ser que el soporte sólido del método de referencia son placas de polietileno de alta captación (NUNC) mientras que las placas utilizadas en la validación del método propuesto son de polietileno estándar irradiadas.<sup>(4,5)</sup>

La cuantificación de la antitoxina diftérica mediante el ELISA desarrollado, es una valiosa herramienta para determinar el nivel de inmunidad contra la difteria, tanto individual como en estudios de población, así como para evaluar inmunocompetencia, y ofrece ventajas significativas en términos de costo, rapidez en la emisión de los resultados, facilidad de uso y adaptabilidad a la automatización.

Los autores consideran como una limitación de este estudio no haber podido referenciar los sueros utilizados como controles, patrón secundario y los utilizados para evaluar el funcionamiento del ELISA con métodos *in vivo* como los ensayos de neutralización de toxinas en conejillos de indias o conejos considerados la “regla de oro” para las evaluaciones de estos anticuerpos.

Médica, avalan su utilización en la práctica clínica y la investigación para cuantificar los valores de antitoxina diftérica en suero humano.

## REREFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ochoa RF, Martínez JC, Ferriol XR, Sotolongo FT. Niveles de antitoxina tetánica y diftérica en recién nacidos y niños preescolares cubanos. Rev Cub Med Trop [Internet]. 2006 [citado:13/07/2017];58(1):44-9. Disponible en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol58\\_1\\_06/mtr08106.pdf](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol58_1_06/mtr08106.pdf)
2. Beyazova U, Guler E, Yucel A, Sahin F. Diphtheria immunity of different age groups in Turkey. Jpn J Infect Dis [Internet]. 2002. Apr [citado: 13/07/2017];55(2):52-4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12082309>
3. CDC. Diphtheria Home For Clinicians. 13th Edition [Internet]. 2015. Abr [citado:15/01/2016]; 7:107-118. Disponible en: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/dip.pdf>
4. Rodríguez Pelier CV, Martínez Téllez G, Torres Rives B, Zúñiga Rosales Y, Alles Gustavo A, Martínez Perera A. Estandarización y validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano. Rev Haban Cienc Méd [Internet]. 2013 [citado:13/07/2017];12(4). Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/246>
5. Ochoa RF, 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 [Internet]. 2006. Ago [citado: 27/07/2017];15(2):13-17. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-028X2006000200003&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2006000200003&lng=es)
6. Fernández R, Ochoa R, Agüero B. Evaluación de la inmunidad contra el tétanos y la difteria en trabajadores del Instituto Finlay ocupacionalmente expuestos a riesgos. Vaccimonitor [Internet]. 2004. Dic [citado:27/07/2017];10(3):10-17. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-028X2004000300002&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2004000300002&lng=es)
7. La Rosa D, Montesino S, Bezos L, Gómez E, Valmaseda T, Alerm A, Ochoa R. Lactancia materna y respuesta humoral contra vacunas de toxoide tetánico y diftérico en niños de 2 años. Vaccimonitor [Internet]. 2011 [citado:27/07/2017]; 20(3):9-13. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v20n3/vac02311.pdf>
8. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). [Internet]. Regulación No. 37-2012. Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos. La Habana: CECMED; 2014. Disponible en: [http://www.cecmec.com/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/reg\\_37-2012\\_buenas\\_practicas\\_lab\\_opt.pdf](http://www.cecmec.com/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/reg_37-2012_buenas_practicas_lab_opt.pdf)
9. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA. [Internet]. 2013. Nov [citado:1/08/2017];310(20):2191–2194. Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/1760318>
10. Anatoxina diftérica purificada estéril. Centro de investigación producción de vacunas Instituto Finlay [Internet]. 2012. [citado:27/07/2017]. Disponible en: [https://www.paho.org/cub/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=instituto-finlay&alias=313-bio-finlay-anatoxina-difterica-purificada-esteril&Itemid=226](https://www.paho.org/cub/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=instituto-finlay&alias=313-bio-finlay-anatoxina-difterica-purificada-esteril&Itemid=226)
11. Ochoa Azze R. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. 2da ed. Ciudad de la Habana: Finlay Ediciones; 2008.

12. Benítez N, Cordoví JM, Zamora R, Cabrera P; De la Paz N, Fernández M. Estabilidad de gotas nasales de efedrina. Rev Colomb Cienc Quím Farm [Internet]. 2015 [citado:27/07/2017];44(2):236-48. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/artic le/view/56296/56219>
13. Espinosa Viñals C, Soroa Millán Y, Martín García Y, Pérez Baños A, Nicot Valenciano M, Rodríguez Noda L, et al. Validación y aplicación de un ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG contra polisacárido capsular Vi de Salmonella Typhi. VaccinMonitor [Internet]. 2015. Abr [citado:27/07/2017];24 (1):21-32. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid =S1025-028X2015000100004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid =S1025-028X2015000100004&lng=es).
14. Von Hunolstein C, Ralli L, Pinto A, Stickings P, Efstratiou A, Czumbel I, et al. Relevance and criticality in an external quality assessment for the determination of diphtheria antitoxin. J Immunol Clin Res [Internet]. 2014 [citado: 27/07/2017];2(2):[aprox.11p.]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/7d2e/7c58b4e5cb5 8719e511a5a6395a8b72a8c51.pdf>
15. Ochoa RF. Técnicas inmunoenzimáticas en el desarrollo clínico de vacunas. La Habana: Finlay Ediciones [Internet]. 2013 [citado:27/07/2017]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/3032491 95\\_Tecnicas\\_inmunoenzimaticas\\_en\\_el\\_desarrollo\\_c linico\\_de\\_vacunas\\_Immunoenzymatic\\_assays\\_for\\_th e\\_clinical\\_development\\_of\\_vaccines](https://www.researchgate.net/publication/3032491 95_Tecnicas_inmunoenzimaticas_en_el_desarrollo_c linico_de_vacunas_Immunoenzymatic_assays_for_th e_clinical_development_of_vaccines)
16. Pérez López E, Rojas Hernández A. Validación de un método para cuantificación de acetaminofén en tabletas de 500 mg por espectrofotometría ultravioleta para la prueba de uniformidad de contenido. Rev Sedes Reg [Internet]. 2016 [citado: 17/08/2017];17(35):1-12. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/666/66646380003.pdf>
17. Cárdenas Carrasco MG, García Alegría AM. Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible. Rev Biotecnia [Internet]. 2015 [citado:17/08/2017];17(1):32-9. Disponible en: <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/art icle/viewFile/15/14>

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### **Contribución de autoría**

Todos los autores participamos en la discusión de los resultados y hemos leído, revisado y aprobado el texto final del artículo.