

Determinación de las condiciones de ensayo óptimas en un ELISA para la detección de anticuerpos séricos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* O11

Tania Valmaseda, Lázaro Alba, Rolando Ochoa, Aniel Moya, Yadira Pino, Sara Catalina Esnard.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de la Habana, Cuba.
E-mail: tvalmaseda@finlay.edu.cu

La selección de sueros de donantes sanos para la obtención de una gamma hiperinmune contra la infección por *Pseudomonas aeruginosa*, así como la evaluación de la respuesta inmunológica de cualquier candidato vacunal contra este microorganismo necesita contar en el laboratorio con técnicas estandarizadas. En este trabajo se realizaron los ensayos necesarios para el montaje y la optimización de un ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos séricos de clase IgG anti-LPS de *P. aeruginosa* O11. Se evaluaron la concentración de recubrimiento, condiciones de bloqueo, dilución de trabajo de las muestras a evaluar y del conjugado con el fin de seleccionar en cada caso las mejores respuestas para el control positivo, el control negativo y el blanco del ensayo. Una concentración de 1,5 µg/mL de LPS O11 en PBS toda la noche a 4 °C como recubrimiento, la necesidad de no incluir un paso adicional de bloqueo y el conjugado humano anti IgG-HRP diluido 1:3000, 1 h a 37 °C resultaron las variables óptimas para el ensayo. Por otra parte, se estableció el rango lineal de la curva del control positivo y se seleccionó la dilución de trabajo 1:100 para las muestras de sueros a evaluar.

Palabras claves: *Pseudomonas aeruginosa*, inmunoglobulina, lipopolisacárido, ELISA, estandarización.

Introducción

Pseudomonas aeruginosa; patógeno gramnegativo versátil y oportunista en términos de su genética, potencial metabólico y mecanismos de virulencia, es causa frecuente de severas infecciones en pacientes hospitalizados a escala mundial, siendo capaz de infectar prácticamente todos los órganos y sistemas del organismo humano (1). La infección causada por este microorganismo es facilitada por la presencia de enfermedades subyacentes como el cáncer y la fibrosis quística, o en pacientes que sufren de heridas por quemadura (2).

Uno de los determinantes de virulencia más relevantes de este germen es el lipopolisacárido (LPS), el cual representa el principal componente de la envoltura de esta bacteria y la base química de la seroespecificidad somática de *P. aeruginosa*, lo que permite que sea utilizado en el diagnóstico de infección por *P. aeruginosa* y en la evaluación de la respuesta inmune de candidatos vacunales (3).

Por otra parte, el empeño por lograr terapias alternativas para combatir las infecciones producidas por *P. aeruginosa* ha ocupado a investigadores de todo el mundo para poder obtener una globulina hiperinmune a partir de sueros de donantes sanos para su aplicación clínica (4, 5, 6). La evaluación de la inmunogenicidad producida por un candidato vacunal o de una gamma específica contra *P. aeruginosa* requiere de un ensayo analítico con adecuada consistencia y reproducibilidad en sus resultados, para lo cual resulta de suma importancia la correcta estandarización de la técnica a emplear.

En este trabajo se resumen los principales resultados en el proceso de determinación de las condiciones óptimas del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) indirecto y cuantitativo, utilizado para la detección de anticuerpos de clase IgG anti-LPS de *P. aeruginosa* O11 en suero de individuos sanos.

Materiales y Métodos

Preparación del estándar y control negativo: Se confeccionó el estándar del ensayo a partir de una mezcla de 13 sueros de individuos enfermos con afecciones crónicas respiratorias y pacientes con fibrosis quística, confirmados de infección por *P. aeruginosa* por pruebas microbiológicas y bioquímicas. También se incluyó un control negativo que consistió en una muestra de suero de un individuo sano que no mostró niveles de anticuerpos por un ELISA indirecto preliminar para la detección de anticuerpos IgG anti-LPS de *P. aeruginosa* O11.

Selección de las condiciones óptimas de ensayo

Recubrimiento: Se evaluaron placas de poliestireno con fondo plano de 96 pocillos Polysorp y Maxisorp, Nunc. Como antígeno de recubrimiento del ensayo se empleó LPS de *P. aeruginosa* O11, a una concentración de 1mg/mL, purificado por el método alcohol-fenólico (7). A partir de éste se evaluaron diferentes concentraciones de recubrimiento desde 0,01 µg/mL hasta 50 µg/mL, diluido en tampón 0,15 M fosfato-salino, pH 7,4 (TFS) usando tiempos de incubación de 2 h a 37 °C o 16-20 h a 4 °C. Para determinar la concentración óptima de recubrimiento se empleó el valor normalizado del estándar con respecto al control negativo (E/N).

Se define como la concentración óptima de recubrimiento a una temperatura, tiempo y amortiguador definido, como aquella en la que el suero estándar alcance la mayor señal, generalmente mantenida a concentraciones superiores ("meseta") y se obtenga la menor señal para el control negativo y el blanco reactivo (8).

Bloqueo: El bloqueo de la placa se realizó con diferentes concentraciones de leche descremada, Merck desde 0,5 g/100 mL hasta 3 g/100 mL en solución TFS con incubación a 37 °C o a 20-25 °C y tiempos de 30 min o 1 h. Para evaluar el bloqueo se empleó igualmente el valor normalizado E/N.

Estándar: Para la determinación del rango de la curva estándar se realizaron diluciones dobles seriadas del mismo desde 1:50 hasta 1:204800 en TFS con Tween 20 al 0,05% (TFS-T) con leche descremada al 3% (TFS-LT) y se incubó 1 h a 37 °C. Posteriormente, se escogieron aquellas

diluciones de la curva que presentaron un coeficiente de determinación $R^2 \geq 0,98$ y se le asignaron 100, 50, 25; 12,5; 6,25; 3,12 unidades (U/mL). Se realizó el ajuste de la curva por ecuación polinomial de segundo orden, se calculó la ecuación de la curva y el coeficiente de determinación (R^2).

Conjugado: Se realizó la estandarización del conjugado anti-IgG humana-peroxidasa de rábano picante (PRP), Sigma Chemical Co., St. Louis, MO (A6029). Para ello se hicieron diluciones de trabajo desde 1:1000 hasta 1:8000 en TFS-LT. Además, se estudiaron las condiciones de incubación de 1 h a 37 °C y 1 h a 20-25 °C. Para evaluar la dilución de trabajo del conjugado se empleó igualmente el valor normalizado E/N.

Se probaron diferentes combinaciones de incubación de las muestras y del conjugado, con las que se compararon la variante 1 con la 2 y con la 3 respectivamente. Estas fueron: 1) muestras 1 h a 37 °C y conjugado 1 h a 37 °C; 2) muestras 1 h a 20-25 °C y conjugado 1 h a 20-25 °C; 3) muestras 2 h a 20-25 °C y conjugado 1 h a 20-25 °C.

Revelado: Se adicionó el sustrato o-fenilendiamina (OPD), Sigma (0,4 mg/mL) en tampón 0,1 M citrato trisódico, a pH 4,5 y peróxido de hidrógeno al 0,04% durante 15 min, protegiéndose de la luz. Luego se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2 N y se realizó la lectura a 492 nm en un lector de ELISA Titertek Multiskan.

Entre cada paso del ensayo se realizaron 4 lavados con agua destilada-Tween 20 al 0,05% para eliminar los excesos de reactantes. Antes del revelado del sistema se duplicó el número de lavados del ensayo.

Método confirmatorio para determinar la verdadera positividad o negatividad de las muestras

Para el ensayo se seleccionaron aleatoriamente 57 sueros de donantes sanos del Banco de Sangre de Marianao negativos a las pruebas de VIH, hepatitis B y toxoplasmosis y 10 sueros de individuos enfermos con afecciones crónicas respiratorias y pacientes con fibrosis quística. Una parte de cada uno de los sueros se absorbió frente a la cepa de *P. aeruginosa* O11, siguiendo el procedimiento que describimos brevemente.

a) Preparación del cultivo de *P. aeruginosa* O11: Se realizó un cultivo a partir de la cepa de referencia serotipo específica de *P. aeruginosa* O11 en el medio de cultivo caldo cerebro corazón (BHI), BIOCEN durante 6 h a 37 °C, con agitación a 200 r.p.m. El cultivo se centrifugó durante 30 min a 11400 x g. A partir de la masa celular se realizó una suspensión celular, la cual se ajustó su concentración por densidad óptica a longitud de onda de 620 nm a 2,5 en un espectrofotómetro Ultrospec 1000.

b) Método de absorción: Se mezclaron 250 µL de la suspensión celular de *P. aeruginosa* O11 previamente ajustada y 250 µL de cada suero diluido 1:50 en leche 6g/100 mL en TFS-T para una dilución final de 1:100 y una concentración de leche del 3 g/100 mL. La mezcla se incubó a 4 °C toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 16 000 x g durante 10 min y se colectó el sobrenadante que se evaluó en el ELISA. Cada muestra se evaluó también sin absorber a una dilución final de 1:100 y condiciones similares a la pareja absorbida.

Se consideró una muestra como realmente positiva cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cada una de las réplicas absorbidas y sin absorber.

Criterio para establecer el valor de corte: Se estableció como valor de corte preliminar el menor valor cuantificable de la curva estándar según los criterios utilizados para la selección de la curva descritos anteriormente.

Cálculo de sensibilidad y especificidad

Para el cálculo de la sensibilidad y especificidad se utilizaron 57 sueros aleatoriamente seleccionados de donantes sanos del Banco de Sangre de Marianao y 10 sueros de individuos enfermos con afecciones crónicas respiratorias y pacientes con fibrosis quística, de los cuales una parte de cada uno de ellos se absorbió frente a la cepa de *P. aeruginosa* O11 siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Se consideró una muestra como realmente positiva cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cada una de las réplicas absorbidas y sin absorber.

Se determinaron los valores de sensibilidad (S) y especificidad (E) según las fórmulas:

$$S = VP / (VP + FN) \quad E = VN / (VN + FP)$$

Donde: VP representa la cantidad de sueros verdaderos positivos, VN la cantidad de verdaderos negativos, FN los sueros falsos negativos y FP los falsos positivos.

Análisis Estadístico: Se realizaron 4 réplicas de cada muestra para cada uno de los parámetros evaluados y se utilizó la prueba de análisis de varianza, diseño en bloques, para determinar la presencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre las distintas combinaciones empleadas. Se empleó la prueba de rangos múltiples en caso de que existieran diferencias significativas para determinar los grupos diferentes y los semejantes. En todos los casos se consideró un $\alpha = 0,05$.

Resultados y Discusión

Selección del soporte sólido y condiciones de recubrimiento

En nuestro ensayo evaluamos primeramente la selección del soporte sólido del ELISA que consistió en placas de poliestireno Maxisorp y Polysorp, Nunc. La placa Polysorp mostró mejor señal del factor E/N que la Maxisorp, con diferencias altamente significativas entre ambos ($p < 0,05$) (Figura 1).

Estos resultados concuerdan con lo esperado debido a que el material de las placas Polysorp es más hidrofóbico que la Maxisorp, favoreciendo la adsorción de antígenos de carácter hidrofóbico como es el caso del LPS que presenta en su estructura una parte lipídica (lípidos A). Las placas Maxisorp favorecen la adsorción de antígenos de carácter hidrofílico (proteínas), por tanto, se ve menos favorecida su unión en este tipo de placas (9).

Para determinar la concentración óptima de recubrimiento analizamos diferentes concentraciones de LPS de *P. aeruginosa* O11, desde 0,01 µg/mL hasta 50 µg/mL en TFS que es ampliamente utilizado para este tipo de técnicas. Se observa en la Figura 2 que la meseta de la curva está desde 0,39 a 12,5 µg/mL ($p > 0,05$).

Figura 1. Estandarización del recubrimiento con LPS de *P. aeruginosa* O11 variando soporte (placas Maxisorp y Polysorp, Nunc), incubación 16-20 h a 4 °C. E/N: Estándar/Control Negativo (Factor de normalización). Dilución de los sueros 1:100. No significación estadística en el rango de "meseta" de la curva 0,39-12,5 µg/mL para placa Polysorp ($p > 0,05$). Significación estadística entre las placas ($p < 0,05$).

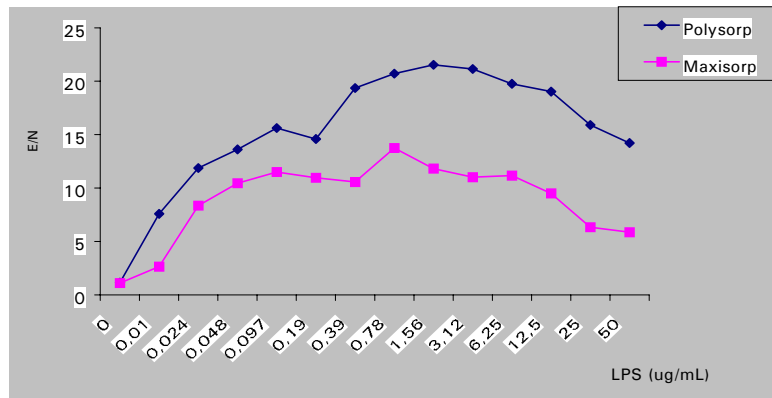
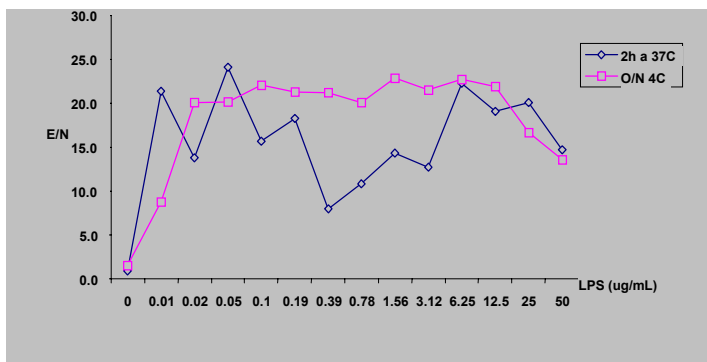


Figura 2. Estandarización de recubrimiento con LPS de *P. aeruginosa* O11 en TFS variando las condiciones de incubación de 2 h a 37°C o 16-20 hs a 4°C en placas Polysorp. E/N: Estándar/Control Negativo (Factor de normalización). Dilución de los sueros 1:100. Significación estadística entre 2 h a 37 °C y 16-20 h a 4°C ($p < 0,05$).



La concentración escogida por nosotros como concentración de trabajo fue de 1,5 µg/mL, valor que se encuentra en el centro de la meseta y así evitamos trabajar en los límites de ésta, ya que a concentraciones menores a 0,39 µg/mL el recubrimiento es insuficiente y a concentraciones mayores de 12,5 µg/mL ocurre el efecto "gancho". Además, se observa mayor estabilidad en las placas Polysorp a condiciones de incubación de 16-20 hs a 4 °C con diferencias altamente significativas con respecto a la incubación de 2 h a 37 °C ($p < 0,05$). Al parecer, esta última condición no es suficiente para la adsorción del antígeno a la placa. El tiempo y la

temperatura son condiciones directamente proporcionales a la adsorción, en el segundo caso debido al aumento de la velocidad de difusión que incrementa la interacción entre la biomolécula y la fase sólida, se requiere también un tiempo apropiado para lograr una inmovilización efectiva (10).

Por otra parte, la sensibilización de la placa 16-20 hs a 4 °C permite optimizar el tiempo de realización de la técnica haciéndola más apropiada al laboratorio.

Determinación de la necesidad de incluir un paso de bloqueo.

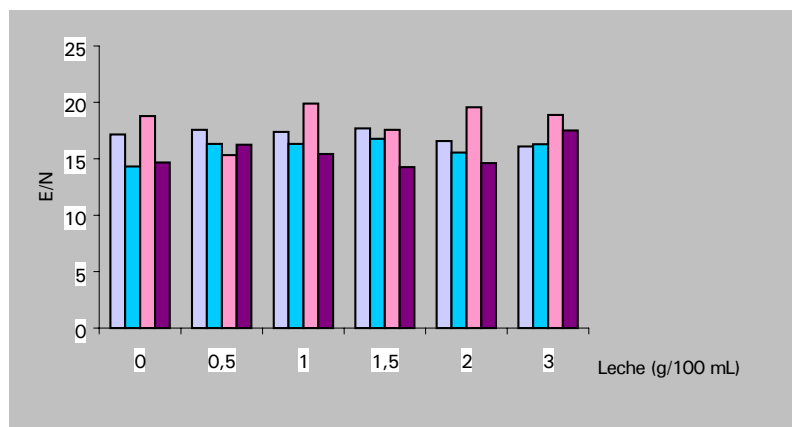
Tratando de establecer un patrón a seguir en el paso de bloqueo, se evaluaron diferentes concentraciones de leche descremada a diferentes tiempos y temperaturas de incubación. Algunos autores plantean que el lavado con Tween 20 al 0,05% hace innecesario este paso. Aún y cuando se mantuvieran algunos espacios sin cubrir, la concentración de leche descremada y el Tween 20, constituyentes del amortiguador empleado para la dilución de las muestras y del conjugado, contribuirían a minimizar las interacciones inespecíficas (11).

Se debe tener en cuenta que el Tween 20, al igual que otros detergentes, ejerce un efecto bloqueador al competir con otras moléculas por los sitios de unión hidrofóbicos e hidrofílicos (11). También la leche descremada, además de ser un excelente agente bloqueador, proporciona una concentración proteica y glucídica apropiada para la estabilización de los inmunoreactantes en fase líquida (8).

En nuestro trabajo, cuando analizamos las condiciones de incubación para el bloqueo a las diferentes concentraciones de leche descremada desde 0g/100 mL hasta 3g/100 mL no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre

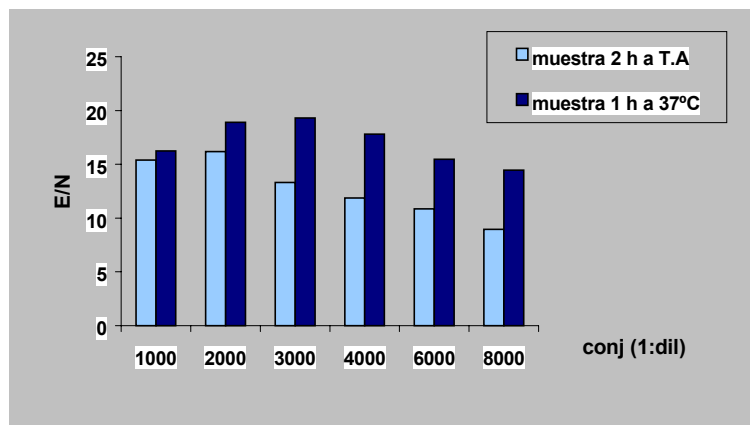
ellas, así como tampoco entre las concentraciones de leche descremada evaluadas, para las cuales se obtuvo una respuesta elevada y semejante del estándar positivo en todas las variantes evaluadas (Figura 3).

Figura 3. Estandarización del Bloqueo. Prueba con leche descremada en TFS, a 37°C y 20-25 °C. E/N: Estándar/Control Negativo (Factor de normalización). Dilución de los sueros 1:100. No significación estadística entre no bloqueo y bloqueo ($p > 0,05$).



Por tanto, decidimos no incluir un paso adicional de bloqueo con leche descremada, lo que nos permite ahorrar reactivo y tiempo en la realización del ensayo.

Figura 4. Estandarización del conjugado anti-IgG humana-PRP. Conj.: Conjugado. T.A. temperatura ambiente. E/N: Estándar/Control Negativo (Factor de normalización). Dilución de los sueros 1:100. Significación estadística entre 1 h a 37°C y 1 h a 20-25 °C ($p < 0,05$). No significación estadística en el conjugado 1 h a 37°C entre las diluciones 1:2000, 1:3000 y 1:4000 ($p > 0,05$).



Determinación de las condiciones óptimas del conjugado

En este ensayo se establecieron las condiciones para el conjugado anti-IgG humana-PRP. Se analizaron varias diluciones del conjugado desde 1:1000 hasta 1:8000 por 1 h a 37 °C y a temperatura ambiente. En la Figura 4 se observa que las diluciones de conjugado 1:1000, 1:2000, 1:3000 y 1:4000 mostraron las mejores diferencias en las señales de absorbancia entre el estándar y el control negativo (E/N). Por otra parte, las diluciones de conjugado desde 1:4000 a 1:8000 no mostraron señales de absorbancia adecuadas para este tipo de ensayo, es decir, estas diluciones del conjugado no permitieron detectar la concentración real de anticuerpos presente en la muestra, lo que puede deberse a uniones inespecíficas con la matriz sólida. Además, entre las diluciones 1:2000, 1:3000 y 1:4000 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) y sí entre estas y las demás diluciones ($p < 0,05$), por lo que decidimos trabajar con 1:3000 que es una dilución intermedia y nos permite un uso eficiente de este reactivo que tiene un alto precio en el mercado internacional.

Por otra parte, analizando la dilución escogida (1:3000) se demostró que hay diferencias significativas entre las condiciones de incubación de 1 h a 20-25 °C y 1 h a 37 °C ($p < 0,05$), siendo esta última

condición la más factible para trabajar el conjugado a una dilución 1:3000. Por otra parte, debido a que el tiempo de incubación de 1 h a 20-25 °C pudo haber resultado insuficiente para la correcta interacción antígeno-anticuerpo, evaluamos además las mismas condiciones, pero por 2 h a 20-25 °C para la incubación de las muestras (Figura 5). All igual que el ensayo anterior existieron diferencias significativas entre las variantes evaluadas

Figura 5: Estandarización del conjugado anti-IgG humana-PRP para tiempos de incubación de las muestras de 2h a 20-25,°C y conj 1 h a 20-25,°C y muestras y conj 1h a 37°C. Conj.: Conjugado. E/N: Estándar/Control Negativo (Factor de normalización). Dilución de los sueros 1:100. Significación estadística entre las condiciones probadas ($p < 0,05$).

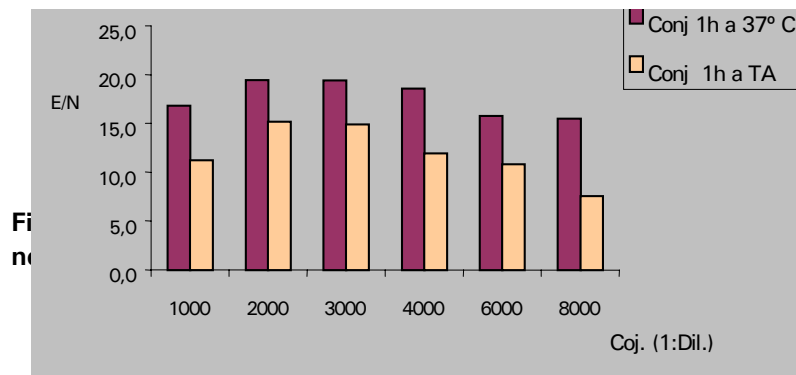
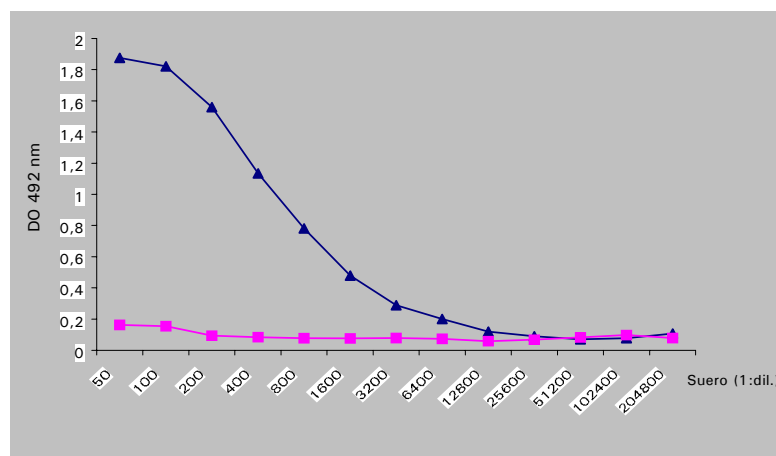


Figura 6. Determinación del rango lineal del estándar. □: Control negativo; Δ: Estándar.



En resumen, las condiciones óptimas de ensayo para la determinación de los anticuerpos de clase IgG en suero humano fueron: recubrimiento con LPS de *P. aeruginosa* O11 a una concentración de

($p < 0,05$); lo que corrobora que la mejor condición para el conjugado es 1 h a 37 °C, esto puede deberse a una mayor estabilidad de la temperatura en comparación con la temperatura del laboratorio.

1,5 µg/mL en PBS e incubación 16-20 hs a 4 °C; sin realización de un paso de bloqueo; muestras estándar y control negativo diluidos en TFS-LT incubando 1h a 37 °C; conjugado anti-IgG humana-PRP en dilución 1:3000 en TFS-LT , 1 h a 37 °C.

Determinación del rango de trabajo de la curva estándar

El reporte de los resultados de un ELISA puede darse en forma cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa. En este último caso, pueden prepararse estándares a partir de mezclas de diferentes muestras (sueros u otro material biológico), garantizando así un comportamiento paralelo acorde al de la población estudiada (12). El uso de estándares para la construcción de las curvas y muestras controles para la calibración interna, garantizan la consistencia analítica. Los resultados son proporcionales a los títulos y se dan en una escala continua; expresándose en unidades arbitrarias (U/mL), en concentración o actividad, usualmente µg/mL o Unidades Internacionales (UI/mL), previa calibración contra estándares de referencia (13).

En nuestro trabajo se realizó la titulación del estándar para escoger el rango lineal de la curva y la dilución óptima de trabajo del mismo. En la Figura 6 se observa que el rango lineal fue desde la dilución 1:100 hasta 1:3200 con un $R^2 = 0,9838$.

El excelente coeficiente de determinación observado demuestra la buena linealidad y paralelismo del rango de la curva escogida, esto indica además que, probablemente cualquier dilución incluida en la curva puede ser tomada para la evaluación de las muestras de suero.

Otra ventaja de los métodos cuantitativos estriba en que los resultados de las muestras pueden alcanzarse con una sola dilución, previa selección de la misma acorde al nivel de detección requerido. Se ahorra además tiempo al simplificarse el procesamiento de las muestras y se abaratan los costos (14).

Determinación de la dilución óptima de trabajo de las muestras y del valor de corte

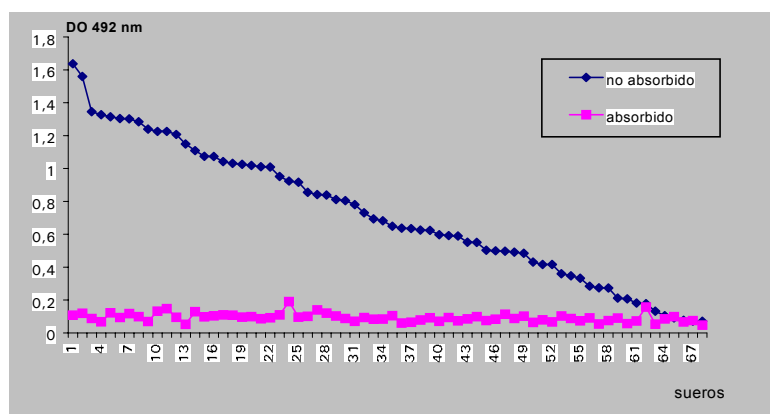
Para la evaluación de candidatos vacunales y la selección de sueros humanos para la obtención de una gamma específica contra *P. aeruginosa* es imprescindible contar con un ensayo cuantitativo que permita seleccionar, de forma sencilla, exacta y rápida, sueros con altos niveles de anticuerpos. En nuestro trabajo la dilución escogida para el análisis de las muestras fue 1:100 porque la

mayoría de las muestras positivas (97%) fueron cuantificadas por la curva y ninguna excedió el límite superior de esta, por lo que sería innecesario comenzar a diluciones menores. Además, tomamos como criterio de valor de corte preliminar todas aquellas muestras que mostraron valores superiores a una concentración de 3.12 U/mL de anticuerpos de tipo IgG anti-LPS de *P. aeruginosa* O11, menor valor que puede ser cuantificado. Es necesario plantear que este valor pudiera variar en dependencia del uso del ensayo para evaluaciones, ya sea de candidatos vacunales o de selección de sueros para la obtención de una gamma específica contra *P. aeruginosa*, lo que reclama estudios adicionales.

Evaluación de la real positividad de los sueros.

Para evaluar la real positividad de nuestro ensayo realizamos un método confirmatorio basado en la absorción de una parte de las muestras frente a células enteras de *P. aeruginosa* O11 y se probaron en el ELISA en forma absorbida y no absorbida (Figura 7).

Figura 7: Evaluación de la verdadera positividad y negatividad a *P. aeruginosa* en las muestras de sueros de individuos sanos. Absorción de los sueros frente a células enteras de *P. aeruginosa* O11. Dilución de los sueros 1:100.



Todos los sueros de individuos enfermos no absorbidos mostraron una señal alta frente al LPS, la cual cayó completamente al ser absorbidos con las células de *P. aeruginosa* O11. Por otra parte, la mayor parte de los sueros negativos no absorbidos mostraron una señal elevada en presencia del LPS, sin embargo el 91% al ser absorbidos la señal cayó significativamente ($p < 0,05$); sólo el 9% mantuvo la misma señal antes y después de absorbidos, lo que

corroboró la verdadera negatividad de los sueros en el análisis estadístico realizado. Hubo sueros que por la señal mostrada se pudieran considerar como positivos, pero debido a que se encuentran por debajo del valor de corte se tomaron como falsos negativos, lo que afecta la sensibilidad del ensayo.

Evaluación del valor preliminar de la sensibilidad y la especificidad

Por último, aunque la cantidad de muestras estudiadas, debido sobre todo a la escasez de sueros negativos, las muestras evaluadas nos permiten dar un criterio preliminar sobre la sensibilidad y especificidad del método (Tabla 1) de 96,7% y 100% respectivamente. Cabe señalar que estos valores pudieran variar cuando se evalúen una mayor cantidad de muestras positivas y negativas.

Tabla 1: Clasificación de los sueros probados para el cálculo preliminar de la sensibilidad y especificidad.

Verdaderos positivos (VP)	Verdaderos negativos (VN)	Falsos negativos (FN)	Falsos positivos (FP)
59	6	2	0

Contrariamente a lo que pudiera creerse, todos estamos en contacto diariamente con *P. aeruginosa*, ya que se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza. De hecho, se obtienen aislamientos de esta bacteria a partir de entre el 2% y el 8% de las heces de personas sanas lo que nos muestra que nuestro contacto con esta bacteria es cotidiano y sólo representa una amenaza para nuestra salud en condiciones especiales (15) tales como, el cáncer y la fibrosis quística o en pacientes que sufren de heridas por quemadura (1, 2). Esto apoya nuestros resultados, en los que la gran mayoría de los sueros de individuos sanos evaluados presentaron niveles detectables de anticuerpos IgG anti-LPS de *P. aeruginosa* O11. No obstante, se hace necesario evaluar un número mayor de sueros humanos para poder afirmar que la población cubana tiene estos niveles de anticuerpos contra esta bacteria.

En resumen, se siguió un protocolo satisfactorio para la optimización del inmunoensayo, lo cual nos permitió llegar a establecer un método homogéneo y cuantitativo para evaluar la presencia de anticuerpos de tipo IgG anti-LPS de *P. aeruginosa* O11 en suero de humano. Este ensayo constituye una de las herramientas imprescindibles en el laboratorio para la selección de sueros humanos para la obtención de una gamma específica y para la evaluación de futuras preparaciones de candidatos vacunales contra *P. aeruginosa*.

Referencias

- De Jawetz, Melnick, Adelberg G.F., Brooks J.S., Butel L.N. *Microbiología Médica*. 15^{ta} Edición. Ornston eds. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. México, DF. 1996; 265-272.
- Pruitt B.A. Mc., Manus A.T., Kim S.H., Goodwing C.W. Burn Wound Infections: Current Status. *World J.Surg.* 1998; 22: 135-145.
- Migazaki L.M. Rol of exotoxin A in including severe *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *J-Med-Microbiol.* 1995; 43(3):169-75.
- Rosenthal SM, Millican RC, Rust J.. A factor in human γ globulin preparations active against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1957; 94:214-17.
- Wye J, Collins M.S, Baylor m, Pennington J.. *Pseudomonas* Hyperimmune Globulin passive immunotherapy for Pulmonary Exacerbations in cystic Fibrosis. *Pediatric pulmonology.* 1990; 9:7-18.
- Hernández J. Simplificación del proceso de purificación del INTACGLOBIN y seguridad en la no transmisión de virus. Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de La Habana; 1997.
- Wesphal O., Jam K. Bacterial lipopolisaccharides. En Whistter, (editor). *Methods in carbohydrate chemistry. Academic Press. Inc New York.* 1965; 5:83-91.
- Ochoa R., Martínez J.C., Ferriol X., Estrada E., García A.M., Blanco R., y col. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor;* 2000; 9(3): 13-8.
- Labsystems Research Centre. *Studies on Immobilization of Biological. Materials Enhanced Adsorption to Modified Polystyrene.* Finland: Labsystems. 1998; 115.
- Harlow E. y Lane D., editors. *Immunoassays. En: Antibodies. A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1998: 553-612.
- Steinitz M. Quantitation of the blocking effect of tween 20 and bovine serum albumin in ELISA microwells. *Analytical Biochemistry.* 2000. 282: 232-8.
- Ann N.Q., Hong H.A., Nhon T.N., Think N.D., Van N.T. y Hendriks J. Tetanus antibodies measured by the toxin binding inhibition test (ToBI) in mothers and children in the Neonatal Tetanus Program in Vietnam. *Dev Biol Stand.* 1999; 101:247-253.
- Ochoa R., Martínez J.C., Ferriol X., García A.M., Estrada E., Blanco R., y col.. Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor.* 1999; 8(10): 9-13.
- Tijssen P. Processing of data and reporting of results of enzyme immunoassays. En: Burdon RH, van

Knippenberg PH, editors. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and theory of enzyme immunoassays. London: Elsevier.1993;385-421.

15. Hardalo, C. y S. C. Edberg Pseudomonas aeruginosa: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 1997;23:47-75.

Determination of the optimal assay conditions for an ELISA to detect serum IgG antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* O11 lipopolysaccharide

Abstract

An indirect quantitative ELISA was developed for the evaluation of the immune response elicited by *Pseudomonas aeruginosa* vaccine candidates, and for obtaining hyperimmune immunoglobulins to be used in the medical treatment. Standard and control sera were made, and the optimal LPS coating dilution of the polystyrene plates, and the sample and conjugate dilutions were established. A 1.5 µg/mL concentration of O11 LPS in PBS, incubated for 16-20 h at 4°C were found to be the best coating conditions. The blocking step was unnecessary. A 1:100 dilution for the serum samples and 1:3000 for the anti-human IgG:HRP conjugate were selected. Accurate quantitative determinations were possible in the lineal range of the standard curve.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, immunoglobulin, lipopolysaccharide, ELISA, standardization.