

Estandarización de un ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG contra vesículas de membrana externa de *Salmonella* Paratyphi A

Yosbany Pérez-Barrios*, Yisabel Aranguren-Mazorra**, Caridad Zayas-Vignier, Kirenia Blain-Torres, Mabel Hernández-Cedeño, Yaimara Rodríguez-Hernández, Maylin Álvarez-Tito, Darcy Nuñez-Martínez, Elizabeth González-Aznar, Jean P Soubal-Mora, José L Pérez-Quiñoy, Dagmar García-Rivera, Sonsire Fernández-Castillo, Reinaldo Acevedo-Grogues

Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

email: ypbarrios@finlay.edu.cu; yaranguren@finlay.edu.cu

Salmonella Paratyphi A es un patógeno exclusivo de humanos, siendo la segunda causa más común de fiebre entérica en el sudeste asiático. Recientemente la incidencia en este continente ha aumentado, desplazando a *Salmonella* entérica serotipo Typhi como la primera causa de fiebre entérica. En la actualidad no existen vacunas licenciadas contra *S. Paratyphi* A. El Instituto Finlay de Vacunas se encuentra trabajando en la obtención de un candidato vacunal basado en vesículas de membrana externa (VME) contra *S. Paratyphi* A, por lo que se hizo necesario contar con una técnica para la evaluación de su inmunogenicidad. El objetivo de este trabajo fue la estandarización de un ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG contra VME de *S. Paratyphi* A. Para ello, se determinaron las mejores condiciones de este ensayo en cuanto a concentración óptima de recubrimiento y dilución de trabajo del conjugado. Además, se definió el intervalo y linealidad de la curva, la precisión intra e interensayo, la especificidad y el límite de detección. La curva de calibración se generó con un suero estándar interno y presentó un buen ajuste lineal con un $R^2 \geq 0.98$. Los coeficientes de variación en los ensayos de precisión intra e interensayo estuvieron en los intervalos establecidos para cada uno ($\leq 10\%$, $\leq 20\%$ respectivamente). Los resultados obtenidos avalan el empleo de este ELISA cuantitativo para la evaluación de la inmunogenicidad de formulaciones de VME de *S. Paratyphi* A en fases de investigación y desarrollo.

Palabras clave: ELISA, estandarización, *Salmonella* Paratyphi A, Vacunas, Vesículas de Membrana Externa.

Introducción

La fiebre entérica es una causa importante de enfermedades y muertes en muchas partes del mundo, especialmente en países con menos recursos (1). Históricamente, *Salmonella* entérica serotipo Typhi ha sido identificada como la mayor responsable de episodios de fiebre entérica, mientras que *S. Paratyphi* solo se identifica como responsable de un pequeño número de casos. Sin embargo, este panorama ha cambiado en los últimos años, en particular si se analiza por regiones. En las últimas 2 décadas se han aislados más casos de *S. Paratyphi* A que *S. Typhi* en la provincia Guangxi, al sudeste de China (1). De forma general, se ha observado un incremento sorprendente de casos de fiebre entérica por *S. Paratyphi* A en varias regiones de Asia (1-3).

Mundialmente, se han descrito tres serotipos de *S. Paratyphi*. Estos son, *Salmonella* Paratyphi tipo A, B y C. Entre estos tres, *S. Paratyphi* A se ha aislado más

frecuentemente, mientras que muchos menos casos de la enfermedad se han reportado relacionados con los serotipos B y C (3).

Según la Organización Mundial de la Salud, en todo el mundo la incidencia de casos anuales reportados de fiebre tifoidea y paratifoidea es de 21,7 millones y 5,4 millones de casos respectivamente (4, 5).

El tratamiento contra este patógeno está volviéndose un desafío debido a la resistencia a los antibióticos de primera línea tales como cloranfenicol, ampicilina y más recientemente las fluoroquinolonas (6). Uno de los problemas para la prevención de la fiebre entérica es que las vacunas licenciadas contra la fiebre tifoidea no protegen contra las infecciones causadas por *S. Paratyphi* A (2).

Debido a la no existencia de una vacuna licenciada en el mercado que proteja contra este patógeno en el mundo, el Instituto Finlay de Vacunas, Cuba, está desarrollando una

* Licenciado en Microbiología.

** Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.

línea de investigación para la obtención de un candidato vacunal experimental basado en vesículas de membrana externa de *S. Paratyphi A* (VME). Actualmente este centro es líder en el desarrollo de vacunas preventivas en Cuba. Tiene experiencias y resultados novedosos en el trabajo con VME de bacterias Gram negativas, como es el caso de las VME de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, la cual forma parte de la vacuna cubana licenciada VA-MENGOC-BC® (7).

Como parte de la fase de investigación, se requiere de una técnica analítica que posibilite evaluar la inmunogenicidad generada contra VME, para lo cual se desarrolló y estandarizó un ELISA indirecto con el fin de evaluar la respuesta específica de anticuerpos (IgG) inducida en ratones Balb/c inmunizados con una formulación de VME de *S. Paratyphi A*.

Materiales y Métodos

Obtención de las VME. Para la obtención de las VME se empleó una cepa de *S. Paratyphi A* identificada como S (408/I), cultivada en medio IVI (10g/L de extracto de levadura, 5g/L de hidrolizado ácido de caseína, 3 g/L de glucosa, 100 mM fosfatos y 8mM de cloruro de magnesio) a 37°C (8). Una vez obtenida la biomasa celular, se extrajeron las VME utilizando como detergente desoxicolato de sodio al 1%. Las VME fueron purificadas empleando cromatografía de exclusión molecular en una columna empaquetada con Sephacril-300. Las VME se conservaron en buffer fosfato salino y sacarosa (PB-Sacarosa).

Vacunas monovalentes. Se emplearon 3 lotes de una vacuna experimental basada en VME, los cuales fueron formulados por el grupo de Formulación del Departamento de Evaluación de Biológicos del Instituto Finlay de Vacunas. Cada lote contenía 0,2 mg/mL de VME adsorbidos en 0,8 mg/mL de Al⁺³ (AlPO₄). Se empleó como solución amortiguadora, solución tampón fosfato salino al 0,7 M a pH 7,2 (PBS por sus siglas en inglés).

Placebo. Formulación de fosfato de aluminio (AlPO₄) a la misma concentración de la formulación de la vacuna monovalente.

Material de recubrimiento empleado en el ELISA. El lote 1702 de VME de *S. Paratyphi A* se utilizó como antígeno de recubrimiento, con una concentración inicial de 0,886 mg/mL. Este fue obtenido por el Departamento de Obtención de Biomoléculas, perteneciente al área de Investigación del Instituto Finlay de Vacunas.

Animales de experimentación. Se utilizaron ratones de la línea Balb/c hembras, entre 17-22 g de peso, provenientes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorios (CENPALAB, Cuba). Los animales fueron alojados y adaptados según las normas establecidas para el trabajo con animales de laboratorio. Se mantuvieron 7 días en cuarentena antes de iniciar los experimentos, con libre acceso al agua y a la comida. Los experimentos realizados fueron aprobados por el comité de ética institucional y se diseñaron de acuerdo con los protocolos y regulaciones institucionales e internacionales.

Esquema de inmunización. Se inmunizaron 30 ratones con los tres lotes de la vacuna monovalente contra *S. Paratyphi A* (10 animales por lote) y 30 ratones con la formulación placebo (AlPO₄) por vía subcutánea, para un total 60 animales. Se empleó un esquema de 2 dosis de 20 µg en un volumen de 0,1 mL, con un intervalo de 21 días entre las dosis. Las extracciones de sangre se realizaron a tiempo 0 y 17 días después de cada inmunización.

Selección de la concentración óptima de recubrimiento. Para la determinación de la concentración óptima de recubrimiento las placas de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Dinamarca) o Costar (EUA) se aplicaron 100 µL de VME por pocillo como antígeno de captura. Las placas se incubaron durante 12-18 h a 4°C en cámara húmeda. Después, fueron lavadas tres veces con 300 µL por pocillo en un lavador de placas de ELISA (SUMA) con solución de lavado (H₂O (d)-Tween 20 al 0,05%). Se empleó como control positivo una mezcla de sueros positivos contra VME con títulos de anticuerpos con densidades ópticas por encima de 1, como control negativo, sueros de animales inmunizados con solución placebo, y el blanco reactivo fue leche descremada al 1% -PBS 0,15 M pH 7,2-Tween 20 al 0,05%). Se evaluaron concentraciones de recubrimiento entre 0 y 40 µg/mL a una temperatura, tiempo y con el tampón PBS 0,7 M, pH 7,2. Se definió como la concentración óptima de recubrimiento, aquella en la que el suero control positivo alcanzó la mayor intensidad de absorbancia, generalmente mantenida a concentraciones superiores, llegando a formar una meseta y donde se obtiene la menor intensidad de absorbancia para el control negativo y el blanco reactivo (9).

Procedimiento del ELISA de cuantificación. En todos los casos se utilizó un ensayo inmunoenzimático en fase sólida, cuantitativo, de tipo indirecto.

Una vez seleccionada la concentración óptima de recubrimiento, se recubrieron las placas tal como se describió anteriormente y se procede a preparar y adicionar las muestras. Las muestras de sueros y el suero estándar se diluyeron en solución amortiguadora (leche descremada al 1% -PBS-Tween 20 al 0,05%). Las muestras y el control se aplicaron en 100 μ L por pocillo y por duplicado; se realizaron diluciones seriadas, en base 2. Las placas se incubaron 1 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en cámara húmeda y más tarde se lavaron de la forma descrita.

Se adicionaron 100 μ L por pocillo del conjugado en la solución amortiguadora descrita anteriormente. Se usó un anticuerpo anti-IgG de ratón molécula completa, conjugado a peroxidasa de rábano picante (código A4416, SIGMA, EUA). Se incubaron nuevamente 1 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en cámara húmeda y más tarde se lavaron de la forma descrita.

Se aplicaron 100 μ L por pocillo de disolución sustrato (peróxido de hidrogeno (H_2O_2) como sustrato, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina como cromógeno, en tampón citrato 0,05 M a pH 5,0). Las placas se incubaron 25 min en la oscuridad y se detuvo la reacción con 50 μ L por pocillo de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2,5 N. Se leyeron las placas a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas de ELISA (Thermo Scientific, EUA).

Preparación del suero estándar interno. Se confeccionó un suero estándar interno a partir de sueros positivos contra VME. Estos sueros se obtuvieron al inmunizar ratones Balb/c por vía subcutánea con una formulación de VME como se explica en el esquema de inmunización anterior. Concluido el esquema de inmunización se aplicó la eutanasia a los animales con el fin de recolectar la mayor cantidad de sangre. El suero se obtuvo por centrifugación a 800 g por 15 min (microcentrífuga BECKMAN COUTER, Alemania) luego de una incubación a 37°C por 1 h para favorecer la formación del coágulo. Los sueros se evaluaron mediante el ELISA descrito anteriormente. Luego se seleccionaron los sueros de animales con respuestas superiores a 1 de densidad óptica y se mezclaron. Posteriormente se clarificó mediante un filtro de 0,2 μm y se distribuyó en alícuotas en microtubos de 1,5 mL y se almacenaron a -20°C .

Evaluación del rango de la curva. El intervalo de la curva se determinó a partir de la evaluación de 6 réplicas del suero estándar interno en tres días diferentes (18 réplicas en total), con el objetivo de una mayor caracterización del comportamiento típico de la curva. Se realizaron 12 diluciones seriadas en base 2 a partir de

1/100. Se analizaron los coeficientes de determinación (R^2) y de correlación (r), además de los parámetros de la ecuación obtenidos. El ajuste se determinó mediante un análisis de regresión lineal. Se seleccionó el intervalo de la curva compuesta por siete puntos en la cual se alcance un $R^2 \geq 0.98$, así como un coeficiente variación (CV) menor del 10% entre las réplicas de un mismo ensayo y menor del 20% entre los ensayos realizados en los diferentes días. El suero estándar interno recibió una asignación arbitraria de 100 unidades por mililitro (UA/mL), para su empleo como curva de calibración.

Titulación del conjugado anti-IgG de ratón. Se utilizó el mismo suero control positivo y negativo descrito anteriormente. El conjugado anti-IgG de ratón molécula completa unido a peroxidasa de rábano picante (SIGMA) se tituló en diluciones entre 1:6000 y 1:12000, con incrementos de 2000. Se seleccionó como dilución óptima aquella donde el suero control positivo fue mayor y el suero negativo menor.

Precisión del ensayo

Precisión intraensayo: La variabilidad intrínseca del ELISA se determinó mediante la precisión intraensayo. Se evaluó la repetibilidad a través del análisis de cinco réplicas, de cuatro sueros de concentraciones que estuvieran en el rango de la curva de calibración. Se determinaron el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Este último parámetro estadístico no debía superar el 10% para considerar la precisión intraensayo como óptima (10, 11).

Precisión interensayo: Para su determinación se seleccionaron tres sueros de diferentes concentraciones que estuvieran en el rango de la curva de calibración y se evaluaron por duplicado en cuatro diluciones seriadas. La precisión interensayo se evaluó bajo tres condiciones diferentes: un mismo analista en días diferentes, tres analistas en un mismo día (12), y entre dos laboratorios. Esta última condición determina la reproducibilidad del ELISA. El criterio de aceptación fue que el CV no superara el 20% para cada uno de los casos.

Especificidad. Para determinar la especificidad de la técnica, se evaluaron sueros de ratones inmunizados con diferentes inmunógenos contra: *Salmonella* Typhi (polisacárido Vi), serotipos 6B y 19F de *Streptococcus pneumoniae*, células inactivadas de *Bordetella pertussis* y VME de *Neisseria meningitidis* serogrupo B como muestras negativas. Se incluyó además una mezcla de sueros de ratones respondedores inmunizados con VME de *S. Paratyphi* A (SPA) como muestra francamente

positiva. Las muestras se clasificaron en negativas o positivas de acuerdo al nivel de corte identificado en el ensayo.

Valor de corte y límite de detección. Para establecer el valor de corte y límite de detección se procesaron los resultados de la respuesta generada por los animales inmunizados con la vacuna experimental y el control negativo (placebo) así como sueros no relacionados de animales inmunizados, como se describe en el acápite anterior. El límite de detección se calculó como la media de la respuesta de anticuerpos en más tres veces la desviación estándar (DE), y expresada en unidades arbitrarias por mililitros (UA/mL).

Análisis estadístico. Los gráficos y tablas se construyeron en el programa Microsoft Office Excel 2013. La desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (CV) y el coeficiente de determinación (R^2) se calcularon mediante el mismo programa.

Las concentraciones de anticuerpos IgG contra VME se determinaron mediante el programa computacional ELISA for Windows, del Centro para Enfermedades Infecciosas, desarrollado por Plikaytis y Carlone, 2005 (13).

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se empleó para la comparación estadística de los tratamientos experimentales, con un nivel de significación $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0 para graficar y analizar los datos experimentales.

Resultados y Discusión

Actualmente no existen vacunas licenciadas contra *Salmonella Paratyphi A* (14) ni estrategias vacunales basadas en VME del patógeno que puedan ser utilizadas para inducir una respuesta inmunológica protectora contra esta bacteria. El Instituto Finlay de Vacunas, líder en la obtención, evaluación y utilización de VME como vacunas, ha concentrado esfuerzos para obtener y evaluar un candidato vacunal experimental basado en VME de *S. Paratyphi A*. Para demostrar la eficacia protectora generada por este candidato vacunal en fase de investigación y desarrollo, es necesario contar con una técnica analítica capaz de detectar si se inducen niveles importantes de anticuerpos anti-VME en suero.

La cuantificación de anticuerpos frente a VME se puede realizar mediante ELISA, con el empleo de un suero estándar previamente calibrado y la estandarización de los parámetros que avalen su empleo. La correcta cuantificación de anticuerpos mediante una técnica como el ELISA, permitiría evaluar la inmunogenicidad inducida por este candidato vacunal.

En la Figura 1 se muestra el resultado de la selección de la concentración óptima de recubrimiento para las VME de *S. Paratyphi A*. La concentración de recubrimiento óptima para la VME resultó ser 10 $\mu\text{g/mL}$, en este punto el suero positivo alcanzó un comportamiento de meseta. Según Ochoa (2012), concentraciones entre 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de recubrimiento suelen ser suficientes, aunque

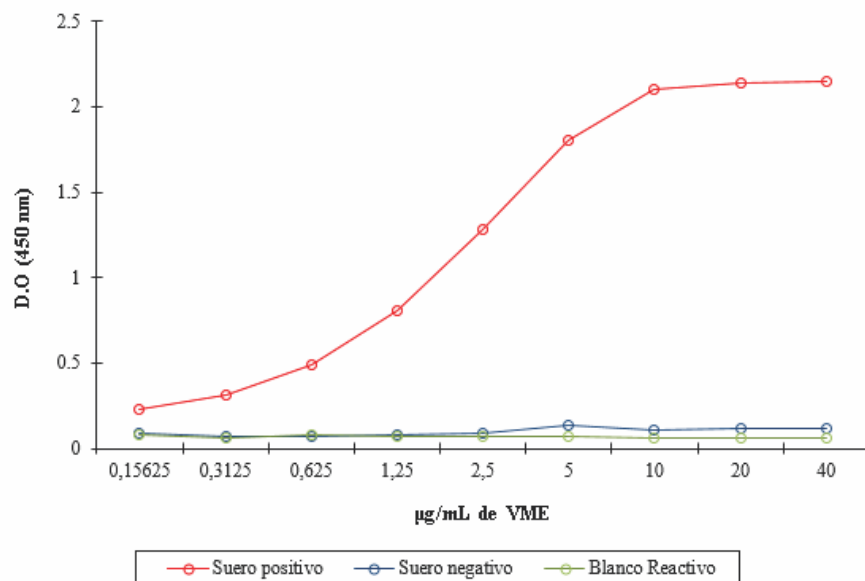


Fig. 1. Evaluación de la concentración óptima de recubrimiento de VME de *S. Paratyphi A*.

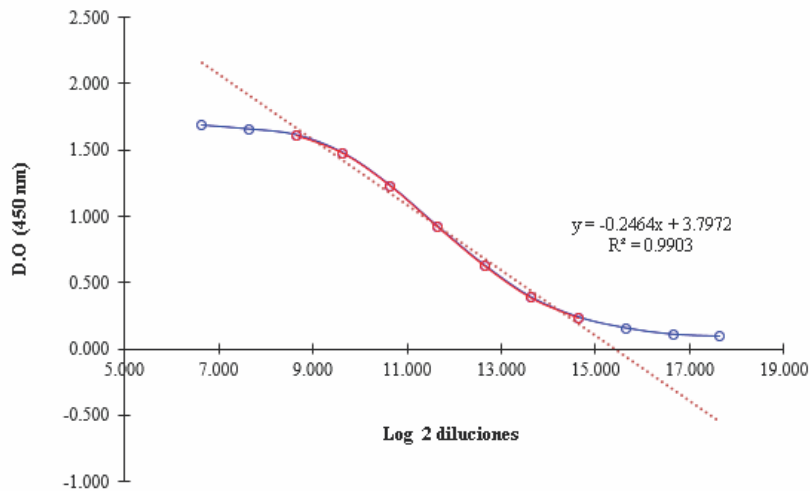


Fig. 2. Determinación del rango lineal de la curva. Exploración del rango de la curva (azul): diluciones entre 1/100 a 1/ 204800. Rango lineal de la curva (en rojo): diluciones entre 1/400 a 1/ 25600.

deben estimarse en cada caso. Elevadas concentraciones pueden provocar una disminución de la sensibilidad y la detectabilidad del ensayo (efecto “gancho”). Este efecto gancho se da por la formación de sobrecapas de biomoléculas débilmente adsorbidas, que se liberan fácilmente en los pasos subsiguientes inhibiendo los inmunorreactantes en la fase líquida (15). Un resultado similar al encontrado en este trabajo lo obtuvieron Mandiarote y colaboradores en el 2012, cuando estandarizaron un ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG inducidos por una vacuna de vesículas de membrana externa de los serogrupos A y W₁₃₅ de *Neisseria meningitidis* (9).

Al evaluar la dilución óptima del conjugado como se explicó en materiales y métodos, se observó que la mayor relación entre el suero positivo respectivo y el suero negativo fue de 1:10000.

En la Figura 2 se observa el típico comportamiento sigmoideal de la evaluación seriada del suero. Se evaluaron doce diluciones seriadas en base 2 del suero estándar a partir de 1:100 (curva azul). Se seleccionaron las siete diluciones con las que se alcanzó el coeficiente

de determinación y correlación con valores por encima a los establecidos ($R^2 \geq 0,98$, $r \geq 0,99$). Las diluciones seleccionadas (rojo) para la construcción de la curva de calibración que tuvieron un buen ajuste lineal, fueron entre 1/400 a 1/25600 (Figura 2), alcanzando un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9903 y un coeficiente de correlación (r) de 0,9995. El suero estándar interno, a la dilución 1/400, recibió una asignación arbitraria de 100 (UA/mL), para su empleo como curva de calibración.

En la Tabla 1 se presentan los resultados correspondientes a la precisión intraensayo realizada a cuatro sueros que se encontraban en el rango lineal de la curva de calibración. Todos alcanzaron valores de CV por debajo del 6 %, siendo el 10 % el máximo exigido para esta prueba. Estos resultados garantizan la repetibilidad del ensayo, considerando la precisión intraensayo como óptima.

Los resultados de la precisión interensayo se presentan en la Tabla 2. Se evaluó la precisión interensayo para tres sueros con diferentes concentraciones que estuvieran en el rango de la curva de calibración, a través de tres

Tabla 1. Evaluación de la precisión intraensayo.

Muestras	réplica 1	réplica 2	réplica 3	réplica 4	réplica 5	Promedio	DS	CV%
1	45,83	43,31	45,33	43,33	46,36	44,83	1,43	3,19
2	71,36	82,46	78,27	80,37	81,21	78,73	4,39	5,58
3	6,15	6,07	6,49	6,44	6,73	6,38	0,27	4,22
4	51,92	49,23	49,04	53,52	52,84	51,31	2,07	4,03

Las réplicas de cada muestra se estiman en UA/mL.

Tabla 2. Evaluación de la precisión interensayo.

Muestras	Días n=4			Analistas n=3			Precisión Interlaboratorio (n=2)		
	Promedio	DE	CV%	Promedio	DE	CV%	Promedio	DE	CV%
1	37,06	3,04	8,20	44,92	3,31	7,37	40,84	5,98	14,63
2	6,42	0,25	3,92	6,37	0,15	2,38	6,78	0,38	5,53
3	49,54	1,14	2,31	51,56	2,19	4,24	48,31	2,30	4,76

La precisión intraensayo se evaluó en tres condiciones diferentes: Un mismo analista en días diferentes (n=4), tres analistas en un mismo día (n=3) y entre dos laboratorios (n=2). La concentración de cada muestra se expresa en UA/mL.

condiciones: un mismo analista en días diferentes, tres analistas en un mismo día y entre dos laboratorios. Para las dos primeras condiciones el valor del CV alcanzado estuvo por debajo de 9%, inferior al valor establecido para esta prueba (20%).

Para el caso de la tercera condición, la cual corresponde a la precisión interlaboratorio, se alcanzó valores de CV por debajo del 15% para los tres sueros, quedando por debajo del valor establecido. Los resultados de la precisión interlaboratorio garantiza la reproducibilidad del ensayo. Los resultados obtenidos destacan la precisión interensayo como óptima.

El límite de detección calculado fue de 0,477 UA/mL. Todos los sueros empleados como controles negativos presentaron respuestas bajas, en todos los casos por debajo de 0,2 de densidad óptica, e inferior al límite de detección, mientras que el suero positivo presentó valores de absorbancia de alrededor de 1,3, muy superiores a las de los otros sueros.

Los resultados de la especificidad del ensayo se pueden observar en la Figura 3.

Todas las muestras negativas evaluadas se encontraron por debajo del Límite de Detección por lo que asumimos este valor como el nivel o valor de corte de la técnica. Este valor permite discriminar entre los animales respondedores de los no respondedores, por lo que cualquier animal que genere un valor de respuesta mayor a 0,477 UA/mL se considera un animal respondedor.

En la Figura 4 se puede apreciar el resultado de la aplicación del ELISA de cuantificación para evaluar la inmunogenicidad inducida por un candidato experimental basado en VME y su control negativo.

En este caso no se pudo emplear una vacuna de *Salmonella Paratyphi A* como control positivo ya que hasta la fecha no existen disponibles en el mercado internacional vacunas licenciadas contra esta bacteria.

Existieron diferencias estadísticas significativas ($p=0,0321$) entre las respuestas generadas por el

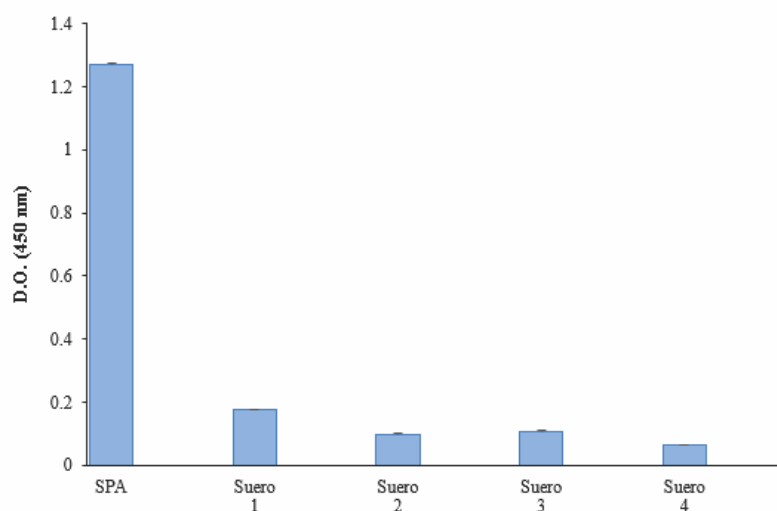


Fig. 3. Especificidad. SPA (suero positivo contra vesícula de membrana externa de *S. Paratyphi A*) y 4 sueros de ratones inmunizados con: polisacárido Vi de *Salmonella Typhi* (suero 1), células inactivadas de *Bordetella pertussis* (suero 2), polisacáridos 6B y 19F de *Streptococcus pneumoniae* (suero 3), vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (suero 4).

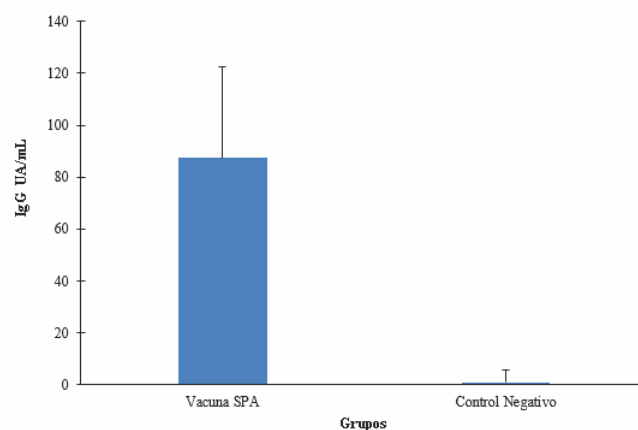


Fig. 4. Especificidad. SPA (suero positivo contra vesícula de membrana externa de *S. Paratyphi A*) y 4 sueros de ratones inmunizados con: polisacárido Vi de *Salmonella Typhi* (suero 1), células inactivadas de *Bordetella pertussis* (suero 2), polisacáridos 6B y 19F de *Streptococcus pneumoniae* (suero 3), vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (suero 4).

candidato experimental basado en VME (SPA) con respecto a la formulación placebo (control negativo). El candidato vacunal generó valores de media geométrica de concentraciones de anticuerpos de 87,46 UA/mL

Conclusión

El ELISA de cuantificación desarrollado en este trabajo permitirá determinar de manera precisa y específica los anticuerpos IgG inducidos por el candidato vacunal basado en VME de *S. Paratyphi A*. Estudios más profundos de estructura y composición serán necesarios para determinar contra qué antígenos se están induciendo las respuestas de anticuerpos y si finalmente estas respuestas son protectoras.

Referencias

- Ochiai RL, Yi X, von Seidlein L, Yang J, Bhutta ZA, Bhattacharya SK, et al. *Salmonella* Paratyphi A Rates, Asia. *Emerging Infectious Diseases* 2005;11(11):1764-6.
- Xiong K, Zhu C, Chen Z, Zheng C, Tan Y, Rao X, et al. Vi Capsular Polysaccharide Produced by Recombinant *Salmonella* enterica Serovar Paratyphi A Confers Immunoprotection against Infection by *Salmonella* enterica Serovar Typhi. *Front. Cell. Infect. Microbiol* 2017;7(135):1-10.
- Bharmoria A, Behari V, Kumar A, Majumder S. Analysis of Attributing Characteristics of *Salmonella* enterica serovar Paratyphi A, B and C across India during 6 years (2010 to 2015). *J Med Microb Diagn* 2016;5(1):1-5.
- Jayavarthini M, Madhusudhan NS, Dhanaleha P, Sivagamasundari D. Emergence of *Salmonella* Paratyphi A and Submergence of *Salmonella* Typhi and Their Trend Over Four Years. *Annals of International Medical and Dental Research* 2016;2(5):7-10.
- Acharya D, Bhatta DR, Malla S, Dumre SP, Adhikari N, Kandel BP. *Salmonella* enterica serovar Paratyphi A: an emerging cause of febrile illness in Nepal. *Nepal Med Coll J.* 2011;13(2):69-73.
- Vlieghe E, Phe T, De Smet B, Veng CH, Kham C, Sar D, et al. Increase in *Salmonella* enterica serovar Paratyphi A infections in Phnom Penh, Cambodia, January 2011 to August 2013. *Euro Surveill* 2013;18(39):1-4.
- Acevedo R, Fernández S, Zayas C, Acosta A, Sarmiento ME, Ferro VA, et al. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Frontiers Immunology* 2014;5(121):1-6.
- Kothari S, Kim JA, Kothari N, Jones C, Choe WS, Carbis R. Purification of O-specific polysaccharide from lipopolysaccharide produced by *Salmonella* enterica serovar Paratyphi A. *Vaccine* 2014;32(21):2457-62.
- Ochoa R, Martínez J C, Ferriol X, Estrada E, García A M., Blanco R, et al. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor* 2000;9(3):13-8.
- Mandiarote A, Gutiérrez N, Valmaseda T, Sosa R, Ontivero I, Talavera A, et al. Estandarización de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para la cuantificación de anticuerpos IgG inducidos por una vacuna de vesículas de membrana externa de los serogrupos A y W₁₃₅ de *Neisseria meningitidis*. *VacciMonitor* 2012;21(2):16-23.
- Pérez-Barrios Y, Aranguren Y, Zayas C, Hernández M, Espinosa-Viñals C, Tirado Y, et al. Estandarización de un ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de anticuerpos IgG contra el antígeno de superficie recombinante del virus de la Hepatitis B inducidos en conejos New Zealand. *Bionatura* 2017;2(4):448-55.
- Espinosa-Viñals C, Soroa Y, Martín Y, Pérez A, Nicot M, Rodríguez L, et al. Validación y aplicación de un ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG contra polisacárido capsular Vi de *Salmonella Typhi*. *VacciMonitor* 2015;24(1):21-32.
- Plikaytis B, Carlone G. Program ELISA for Windows User's Manual, version 2. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta: CDC; 2005.

14. Ravenscroft N, Cescutti P, Gavini M, Stefanetti G, MacLennan CA, Martin LB, et al. Structural analysis of the O-acetylated O-polysaccharide isolated from *Salmonella* paratyphi A and used for vaccine preparation. *Carbohydrate Research* 2015;404:108-16.
15. Ochoa RF. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. La Habana: Finlay Ediciones; 2012.

Standardization of an ELISA for the quantification of IgG antibodies against outer membrane vesicle of *Salmonella* Paratyphi A

Abstract

Salmonella Paratyphi A, is an exclusive pathogen of humans, being the second most common cause of enteric fever in Southeast Asia. Recently the incidence of this disease in this continent has increased, displacing *Salmonella* enterica serotype Typhi as the first cause of enteric fever. Currently there are no vaccines licensed against *S. Paratyphi A*. The Finlay Institute of Vaccines is working on obtaining a vaccine candidate based on outer membrane vesicles (VME) against *S. Paratyphi A*, so it became necessary to develop a technique for the evaluation of its immunogenicity. The objective of this work was the standardization of an ELISA for the quantification of IgG antibodies against VME of *S. Paratyphi A*. The best conditions of this assay were determined in terms of optimum concentration of coating and working dilution of the conjugate. In addition, the interval and linearity of the curve, the intra- and inter-assay precision, the specificity and the limit of detection were defined. The calibration curve was generated with an internal standard serum and presented a good linear fit with an $R^2 \geq 0.98$. The coefficients of variation in the intra- and interassay precision tests were in the intervals established for each one ($\leq 10\%$, $\leq 20\%$ respectively). The results obtained support the use of this quantitative ELISA for the evaluation of the immunogenicity of VME formulations of *S. Paratyphi A* in research and development phases.

Keywords: ELISA, standardization, *Salmonella* Paratyphi A, Vaccines, Outer Membrane Vesicles.

Recibido: Julio de 2018

Aceptado: Septiembre de 2018