

Estandarización del procedimiento analítico para la cuantificación colorimétrica del polisacárido de *Salmonella enterica* serovar Typhi utilizando el método de Hestrin

Felix Cardoso-San Jorge*, Elsa D Rey Contreras, Bárbara Baró-Vicet, Jean Pierre Soubal Mora, Raine Garrido Arteaga, Jessy Pedroso Fernández**, Sonsire Fernández Castillo, Yury Valdés Balbín

Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba.

(*) fcardoso@finlay.edu.cu; (**) jpedroso@finlay.edu.cu

Recibido: 04/02/2026

Revisado: 09/03/2026

Aceptado: 23/04/2026

Resumen

Las vacunas conjugadas son una plataforma efectiva y eficiente contra bacterias encapsuladas como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* tipo b, y *S. enterica* Typhi. Es fundamental cuantificar con precisión el polisacárido capsular, su principal antígeno. Para el polisacárido de *S. Typhi*, se estandarizó el método espectrofotométrico de Hestrin, que cuantifica los grupos O-acetilos. El método se evaluó rigurosamente demostrando ser específico, lineal (rango de 0,05 – 0,75 $\mu\text{mol/mL}$), exacto (recuperación sin diferencias significativas con respecto al 100 % de recuperación), y preciso en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. Este control metodológico garantiza la calidad en el desarrollo de vacunas.

Palabras claves: Espectrofotometría; Estandarización; Método Hestrin; *Salmonella*; Validación

Abstract

Standardization of the analytical procedure for the colorimetric quantification of the polysaccharide of *Salmonella enterica* serovar Typhi using the Hestrin method. Conjugate vaccines are an effective platform against encapsulated bacteria such as *S. pneumoniae*, *H. influenzae* type b, and *S. Typhi*. A safety quantification of the capsular polysaccharide as the main antigen is crucial. The Hestrin spectrophotometric method was standardized for the *S. Typhi* polysaccharide, which relies on quantifying O-acetyl groups. The technique was rigorously evaluated, proving to be specific, linear (in the range of 0.05–0.75 $\mu\text{mol/mL}$), accurate (recovery with no significant difference from 100 % recovery), and precise under repeatability and intermediate precision. This methodological control ensures quality in vaccine development.

Keywords: Spectrophotometry; Standardization; Hestrin Method; *Salmonella*; Validation.

Introducción

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) es el agente causante de la fiebre tifoidea, una enfermedad infecciosa que afecta principalmente a países en vías de desarrollo, con una incidencia mundial estimada en aproximadamente 9 a 21 millones de casos anuales y una mortalidad que puede superar los 100,000 fallecimientos por año, especialmente en Asia y África (Garay et al., 2025; Liu et al., 2025; WHO, 2023). La transmisión ocurre a través del consumo de agua y alimentos contaminados con heces de pacientes enfermos o portadores crónicos, siendo la falta de acceso a agua potable y saneamiento adecuados factores cruciales para su propagación. *S. Typhi* es una bacteria Gram negativa encapsulada, cuyo principal factor de virulencia es el polisacárido capsular Vi (Robbins y Schneerson, 2008), un homopolímero lineal O-acetilado del ácido N-acetil-D-galactosaminurónico, que juega un papel fundamental en la evasión del sistema inmune y es la diana para el desarrollo de vacunas conjugadas que han mostrado eficacia en la prevención de la enfermedad (Liu et al., 2025).

La cuantificación precisa del polisacárido capsular Vi y de los

anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) contra este antígeno es esencial para la evaluación de la inmunogenicidad y la eficacia de las formulaciones vacunales. Entre los métodos más empleados para esta cuantificación se encuentra el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto, que se usa ampliamente para cuantificar anticuerpos IgG contra el polisacárido Vi e indirectamente refleja la cantidad y calidad del polisacárido en formulaciones vacunales. El ensayo inmunológico ELISA se valida mediante un proceso riguroso que incluye la evaluación de intervalos de linealidad, precisión intra e inter-ensayo, exactitud (recuperación), especificidad frente a otros antígenos, límite de detección y cuantificación, así como la robustez. La curva de calibración se construye con un suero estándar interno adecuado, y los coeficientes de variación obtenidos cumplen con criterios regulatorios ($\leq 10\%$ para precisión, $\leq 20\%$ para robustez y recuperaciones entre 90-110 %). Además, la especificidad del método es alta, discriminando correctamente sueros positivos de negativos (Espinosa-Viñals et al., 2015).

La cuantificación del polisacárido capsular Vi de *S. Typhi* tam-

bién se realiza a través de métodos espectrofotométricos, que sometidos a validaciones rigurosas aseguran resultados reproducibles, precisos y específicos para su aplicación en control de calidad y el desarrollo de vacunas. Estos métodos son mucho más rápidos, ventajosos y directos para ensayos rutinarios.

De los métodos espectrofotométricos el más utilizado es el método de Hestrin (1949), que cuantifica el polisacárido Vi mediante los grupos O-acetilos presentes en las moléculas, por lo que para su uso en la fase de investigación-desarrollo-producción de candidatos vacunales es preciso la estandarización-validación del procedimiento analítico (WHO, 2013; Quintana *et al.*, 2019), basado en este método demostrando la especificidad, sensibilidad y reproducibilidad necesarias en el control de calidad y evaluaciones analíticas, en el desarrollo de vacunas.

Parte experimental

Las proteínas Anatoxina diftérica (TD) y Albumina sérica humana (HSA) nativas disueltas en agua destilada, así como los polisacáridos capsulares de *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), los conjugados de los polisacáridos capsulares de *S. Typhi* a las diferentes proteínas (TD y HSA), fueron suministradas por el Grupo de Glicoconjugación de la Dirección de Investigaciones, el agua destilada (pH = 5,0-7,0, conductividad < 1,25 $\mu\text{s}/\text{cm}$) fue suministrada por el grupo de Servicios Críticos de la Dirección de Ingeniería, todos pertenecientes al Instituto Finlay de Vacunas (IFV). Los reactivos utilizados en el desarrollo del procedimiento analítico, bromuro de acetilcolina ($\text{C}_7\text{H}_{16}\text{BrNO}_2$) ($M = 226,12 \text{ g/mol}$) $\geq 98 \%$ p.s.), clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) ($M = 69,49 \text{ g/mol}$, > 99 % de pureza, p.a), hidróxido de sodio (NaOH) ($M = 40,0 \text{ g/mol}$, $\geq 97 \%$, p.a), ácido clorhídrico (HCl) ($M = 58,3 \text{ g/mol}$, densidad 1,19 Kg/L , 37-38 %, p.a), cloruro de hierro III hexahidratado ($\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ($M = 270,33 \text{ g/mol}$, 99-102 %, p.a). La dextrana (polisacárido con estructura $\text{Glc}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{-Glc}(\alpha 1 \rightarrow 6)\text{-Glc}(\alpha 1 \rightarrow 6)\text{-Glc}(\alpha 1 \rightarrow 6)\text{-Glc}$ (2000 Da), fue suministrada por Merck. Todos los reactivos y disoluciones fueron almacenadas y conservadas en las condiciones recomendadas por el fabricante, además fueron utilizadas en su período de vigencia.

Los equipos e insumos (balanzas analíticas, micropipetas, espectrofotómetro UV-visible, agitadores, entre otros) utilizados en la estandarización del procedimiento analítico fueron calibrados por el Grupo de Metrología de la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del IFV. Para ello se basaron en los requisitos descritos en las normas ISO 17025 (ISO/IEC FDIS 17025:2017 (Norma Internacional ISO/IEC, 2017) y las normas cubanas de metrología y normalización de la serie NC.

Procedimiento analítico basado en el método de Hestrin⁶.

A un volumen de 1500 μL de agua destilada como blanco, se le adicionaron 250 μL de una disolución de ácido clorhídrico al 37 % en agua destilada 1:2 (v/v) y se agitó vigorosamente. Seguidamente, de conjunto con los tubos de ensayo que contienen un volumen de 1500 μL de muestra y disoluciones patrones de acetilcolina (bromuro de acetilcolina 0,75 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) en el intervalo de concentraciones 0,05–0,75 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, se le añadió

500 μL de una mezcla de disolución acuosa de hidroxilamina 2 mol/L y disolución acuosa de hidróxido de sodio 3,5 mol/L 1:1 (v/v), se agitó vigorosamente a medida que se adicionaron en los tubos, manteniendo en reposo durante 4 minutos a temperatura ambiente de 20-25 °C. Posteriormente, se adicionaron 250 μL de una disolución de ácido clorhídrico al 37 % en agua destilada 1:2 (v/v), a todos los tubos excepto al blanco. Se agitó vigorosa e inmediatamente. Por último, se adicionaron 250 μL de disolución de FeCl_3 0,74 mmol/L en HCl 0,2 mol/L a todos los tubos. Se agitó vigorosamente. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Visible marca Jenway 6705 (Alemania), a una longitud de onda de 540 nm.

Se determinó el valor de concentración de cada punto de la curva de calibración a partir de las absorbancias y se obtuvo un ajuste lineal a través de la ecuación: $y = mX + a$. La concentración de las muestras se calculó a partir de los valores de absorbancias mediante el método de mínimos cuadrados. Se promediaron los valores de las concentraciones ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) obtenidas, cuyas absorbancias estuvieran dentro del rango de la curva de calibración y que su coeficiente de variación (CV) intraensayo fuera inferior al 5 % (Abreu-Vázquez *et al.*, 2025).

Para la estandarización del procedimiento analítico de cuantificación del polisacárido de *S. Typhi* descrito, se evaluaron los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, exactitud y precisión (Parra *et al.*, 2021; CECMED, 2014).

Especificidad

Se realizó la evaluación del parámetro de especificidad utilizando el procedimiento descrito con muestras de polisacárido Vi natural de *S. Typhi*, conjugados de polisacárido Vi a las proteínas portadoras TD y HSA, a las proteínas portadoras utilizadas HSA, TD y a un polisacárido no relacionado (Dextrana) que carece de grupos O-acetilos en su estructura (CECMED, 2014; Walfish, 2006).

Linealidad

Para evaluar la linealidad se construyó una curva de calibración en el intervalo de 0,05–0,75 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ de grupos O-acetilos, evaluando cada una de las concentraciones por cuadruplicado. Se calculó la ecuación de la recta, su coeficiente de correlación (r), el coeficiente de variación del factor respuesta (CV_f), la desviación estándar relativa de la pendiente (SDb_{rel}), así como se realizó la prueba de proporcionalidad para el intercepto (CECMED, 2014; Walfish, 2006; Borman y Elder, 2017; Dalal *et al.*, 2019).

Exactitud

El parámetro de exactitud se evaluó mediante un experimento de añadido-recobrado. A una muestra de polisacárido de *S. Typhi*, se le añadieron tres cantidades conocidas de acetilcolina (0,125; 0,250 y 0,375 μmoles) respectivamente, se calculó el recobrado y el porcentaje de recuperación se comparó mediante una prueba t de student con el 100 % de recuperación para un nivel de confianza del 95 % (Walfish, 2006).

Precisión

La precisión se evaluó en condiciones de repetibilidad (estudio intra-ensayo) y precisión intermedia (estudio inter-ensayo).

Para el estudio de repetibilidad, se realizó la determinación por sextuplicado de dos réplicas de una muestra de polisacárido de *S. Typhi*, por un mismo analista, en las mismas condiciones de día, laboratorio y equipamiento. Se calculó el coeficiente de variación expresado en porcentaje (CV (%)), comparándolos con el valor del coeficiente aceptado para metodologías basadas en métodos espectrofotométricos, que debe ser inferior al 3 % (Walfish, 2006; Borman y Elder, 2017).

Para el estudio de precisión en condiciones de precisión intermedia, se cuantificó dos réplicas de una muestra de polisacárido de *S. Typhi*, por tres analistas en cuatro días diferentes, en iguales condiciones de laboratorio y equipamiento (Walfish, 2006; Dalal *et al.*, 2019). Para demostrar su cumplimiento, se evaluó que no existieran diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos por los tres analistas durante los cuatro días mediante una comparación de las medias, utilizando la prueba estadística HSD de "Tukey" o "Diferencia Honestamente Significativa (HSD), para un 95 % de confianza.

Procesamiento de resultados

Para la realización de los cálculos, evaluación, procesamiento de los resultados y los parámetros de estandarización estudiados se empleó una hoja de cálculo en Microsoft Excel, versión 2016 (Microsoft, USA) y el programa STATGRAPHICS 5 plus versión 5.1 (StatPoint, Inc, USA).

Resultados y discusión

La estandarización y validación de los métodos analíticos juegan un papel fundamental en la investigación y el desarrollo de candidatos vacunales, ya que de estos procesos depende la obtención de resultados confiables, reproducibles y de alta calidad. Estos resultados son esenciales para evaluar con precisión los índices de calidad durante el desarrollo y evaluación de vacunas (Parra *et al.*, 2021; CECMED, 2014; Walfish, 2006; Borman y Elder, 2017).

En este estudio, el método analítico implementado se clasificó como un ensayo cuantitativo (Walfish, 2006; Borman y Elder, 2017) conforme a la clasificación de las agencias regulatorias de medicamentos, debido a que se trata de un análisis diseñado para cuantificar el contenido del polisacárido de *S. Typhi*, a partir de uno de los grupos funcionales presente en la molécula. La estandarización se diseñó con base en esta clasificación regulatoria, evaluando parámetros claves tales como especificidad, linealidad, precisión (intra-ensayo e inter-ensayo) y exactitud (CECMED, 2014; Walfish, 2006).

Se evaluó la especificidad del método mediante el análisis de muestras de polisacárido natural Vi y de conjugados de este polisacárido a TD y HSA, como proteínas portadoras, así como las proteínas portadoras utilizadas en la obtención de las glicoproteínas y de un polisacárido no relacionado que carece de grupos O-acetilos en su estructura como es la dextrana. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1. Se observó que únicamente las muestras que contienen polisacárido Vi con grupos O-acetilos en su estructura reaccionaron químicamente con los reactivos del método de Hestrin (1949), mostrando concentraciones cuantificables. Por otro lado, en las muestras de proteínas portadoras y en el polisacárido no relacionado no se detectó señal analítica, lo que demuestra que el procedimiento es específico para los grupos O-acetilos, sin evidencia experimental de interferencias provenientes de las proteínas portadoras o del polisacárido carente de grupos O-acetilos.

Los espectros de absorción en el intervalo de longitudes de onda (λ) desde 400-700 nm que se muestran en la figura 1 corroboran los resultados reportados en la tabla 1, no observándose absorción de las muestras de la dextrana y la proteína toxoide diftérico (TD) y sí, para aquellas muestras de O-Acetilo, polisacárido natural Vi y de conjugados de este polisacárido a TD, que si presentan grupos O-Acetilo en su estructura.

El estudio de la linealidad de la curva de calibración dentro del rango de trabajo definido (0,05–0,75 $\mu\text{mol/mL}$), resultó satisfactorio. En la figura 2, se muestra el gráfico de la curva de calibración, observándose una función lineal. Además, la tabla 2 muestran todos los análisis estadísticos realizados, re-

Tabla 1. Procesamiento del estudio de la especificidad del procedimiento analítico.

Muestras	A ₁	A ₂	A ₃	A _M	C ₁ ($\mu\text{Mol/mL}$)	C ₂ ($\mu\text{Mol/mL}$)	C ₃ ($\mu\text{Mol/mL}$)
PsN Vi	0,116	0,116	0,117	0,116	2,368	2,368	2,389
	0,065	0,067	0,066	0,066	2,603	2,686	2,644
PsN Vi-HSA	0,146	0,149	0,150	0,148	11,983	12,234	12,318
	0,070	0,076	0,075	0,074	14,059	15,314	15,105
PsN Vi-TD	0,115	0,115	0,115	0,115	0,939	0,939	0,939
	0,061	0,070	0,066	0,066	0,974	1,125	1,049
HSA	0,005	0,003	0,008	0,005		ND	
TD	0,002	0,006	0,007	0,005		ND	
Dextrana	0,005	0,001	0,002	0,003		ND	

PsN Vi: Polisacárido natural *S. Typhi*, PsN Vi-HSA: conjugado Polisacárido natural *S. Typhi* a albumina sérica humana, PsN Vi-TD: conjugado Polisacárido natural *S. Typhi* a anatoxina diftérica, HSA: Albumina sérica humana, TD: anatoxina diftérica, A 1,2...n: Absorbancias de cada réplica, Am: Absorbancia media, C1, 2...n: Concentración de cada réplica, ND: No detectable.

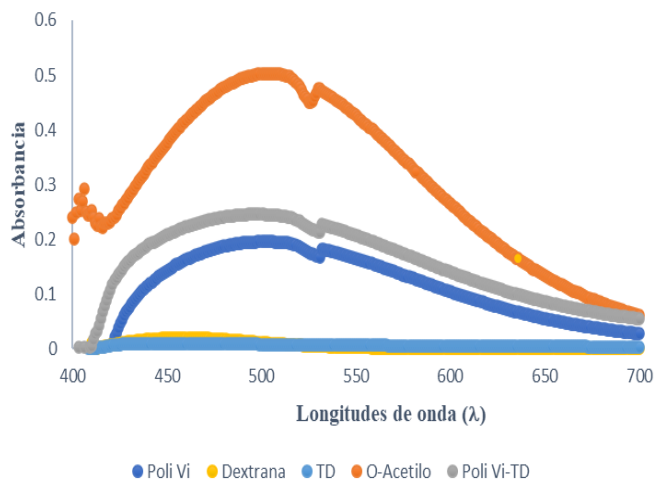


Fig. 1: Espectros de absorción (λ) 400-700 nm. naranja (O-Acetilato), gris (Poli Vi-TD), azul oscuro (Poli Vi), azul claro (TD), amarillo (Dextrana).

portando el cumplimiento de los criterios de aceptación establecidos para cada prueba. La ecuación de la curva de calibración obtenida fue $Y = 0,2472X + 0,0012$, con un coeficiente de correlación (r) de 0,9997, lo que indica una excelente relación lineal entre la concentración (Walfish, 2006; Borman y Elder, 2017) y la señal analítica.

Además, el coeficiente de variación del factor respuesta (CV_f) (absorbancia/concentración) fue del 4,93 %, reflejando una adecuada precisión del método en términos de variabilidad relativa. La desviación estándar relativa (SDb_{rel}) calculada fue del 0,69 %, demostrando la consistencia en las mediciones. Al aplicar la prueba de proporcionalidad del intercepto, el intervalo de confianza obtenido fue $[-0,0108; 0,0011]$, lo que sugiere que el intercepto no difiere significativamente de cero (Walfish, 2006; Borman y Elder, 2017), confirmando la proporcionalidad requerida para un método cuantitativo validado. Adicionalmente se demostró el cumplimiento de la ley de Beer-Lambert. Por tanto, podemos decir que el método desarrollado es lineal en el rango de concentraciones estudiadas (García Martínez, 2012).

El análisis estadístico de la media de los porcentajes de recobrado (97,79 %) proporcionó un valor p de 0,211858, superior

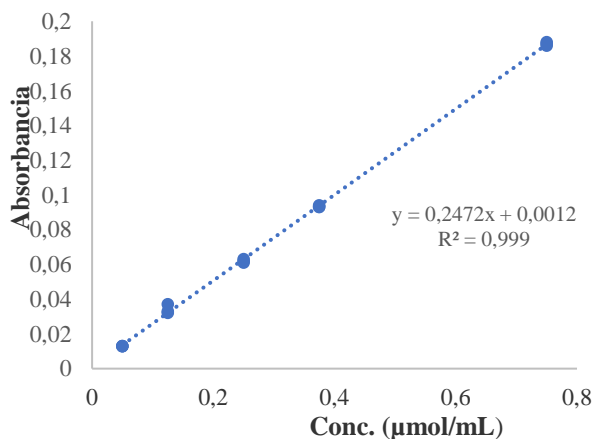


Fig. 2: Gráfico de la curva de calibración.

Tabla 2. Comparación de los resultados experimentales y los criterios de aceptación para el estudio de la linealidad del método de cuantificación de Hestrin.

Parámetros	Teórico	Experimental
Ecuación de la recta	$y = mX + a$	$Y = 0,2472X + 0,0012$
r	$\geq 0,99$	0,9997
CV_f	$\leq 5 \%$	4,93
SDb_{rel}	$\leq 2 \%$	0,69
Intercepto (a)	0 incluido en IC (a)	$[-0,0108; 0,0011]$

r : coeficiente de correlación, CV : coeficiente de variación del factor respuesta, SDb_{rel} : desviación estándar relativa de la pendiente, IC (a): intervalo de confianza del intercepto.

Los resultados del estudio de exactitud del procedimiento analítico se presentan en la tabla 3. Para evaluar la exactitud se realizó un experimento de añadido-recobrado, comparando los porcentajes promedio de recobrado obtenidos con el valor teórico del 100 % para un nivel de confianza del 95 %. En este contexto, se calcularon los porcentajes de recobrado para cada adición individual, así como el recobrado global considerando las tres adiciones, al nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$). Por lo tanto, se puede plantear que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los recobros experimentales y el valor teórico del 100 %.

Los resultados obtenidos están en concordancia con estudios previos en la validación de métodos analíticos para vacunas y productos farmacéuticos, donde se han reportado porcentajes de recobrado entre 90 y 110 % considerados aceptables para métodos cuantitativos (Espinosa-Viñals *et al.*, 2015), por lo que podemos plantear que en las condiciones estudiadas el procedimiento es exacto.

Estos hallazgos respaldan la confiabilidad del método desarrollado para la cuantificación en estudios de candidatos vacunales, asegurando que los resultados obtenidos reflejan con fidelidad el contenido real del analito.

Tabla 3. Estudio de la exactitud del procedimiento analítico de Hestrin mediante un experimento de añadido recobrado.

μ moles muestra	μ moles añadidos	μ moles recobrados calculados	% recobrado	% recobro global
0,244	0,125	0,249	94,993	97,790
		0,236	94,993	
		0,265	94,993	
	media		94,993	
	0,250	0,425	93,848	
		0,444	98,999	
0,395		92,132		
media		94,993		
0,375	0,744	100,334		
	0,741	102,623		
	0,760	107,201		
media		103,386		

Los resultados de la evaluación de la precisión en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia cumplen los criterios de aceptación preestablecidos (Walfish, 2006; Dalal *et al.*, 2019), los CV son inferiores al 3 % para la repetibilidad (tabla 4) y el estudio de la precisión en condiciones de precisión intermedia mediante la comparación de los resultados de concentración de polisacárido de *S. Typhi*, determinados por tres analistas durante cuatro días, utilizando la prueba estadística HSD de "Tukey", realizado a un nivel de confianza del 95 % (figura 3), indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los análisis realizados, por lo que podemos plantear con un 95 % de confianza que las variables estudiadas (analistas y días de ensayo) no incidieron negativamente en el estudio de precisión en condiciones de precisión intermedia. Los valores medios de concentración de polisacárido de *S. Typhi*, fueron muy similares (0,884, 0,889 y 0,903) y las diferencias entre pares de analistas estuvieron dentro de los límites críticos ($\pm 0,0435$), lo que refleja una alta reproducibilidad y consistencia inter-analista. Estos resultados sustentan la robustez y fiabilidad del método analítico empleado, demostrando que la variabilidad atribuible al operador es mínima y no afecta la precisión del procedimiento. Se puede destacar que la ausencia de diferencias significativas entre analistas respalda la validez y

confiabilidad del procedimiento analítico, un requisito importante en el contexto regulatorio para métodos utilizados en desarrollo y control de vacunas, donde la estandarización y reproducibilidad entre operadores deben estar garantizadas.

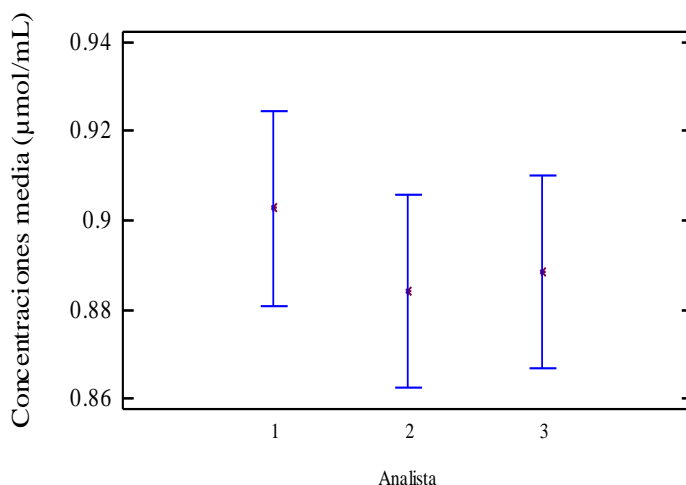


Fig. 3: Resultado del estudio de precisión intermedia del procedimiento analítico de cuantificación por el método de Hestrin comparando los resultados obtenidos por tres analistas en cuatro días consecutivos, utilizando la prueba estadística HSD de "Tukey".

Tabla 4. Estudio de precisión en condiciones de repetibilidad para el método de cuantificación de Hestrin

		Repeticiones						SD	C _{Media} (µmol/mL)	CV (%)
		1	2	3	4	5	6			
Réplica 1	C ₁ (µmol/mL)	0,789	0,803	0,789	0,817	0,796	0,796	0,023	0,804	2,81
	C ₂ (µmol/mL)	0,831	0,761	0,789	0,817	0,811	0,826			
	C ₃ (µmol/mL)	0,831	0,817	0,831	0,803	0,752	0,811			
Réplica 2	C ₁ (µmol/mL)	0,789	0,782	0,803	0,775	0,834	0,804	0,023	0,798	2,89
	C ₂ (µmol/mL)	0,789	0,768	0,803	0,789	0,849	0,841			
	C ₃ (µmol/mL)	0,782	0,810	0,782	0,810	0,782	0,782			
General (medias)							0,023	0,801	2,83	

C_{1...m}: concentración, C_m: concentración media (µmol/mL), SD: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

Conclusiones

Mediante el diseño de experimentos propuesto para la estandarización de un procedimiento analítico basado en el método de Hestrin, se demostró que, en las condiciones del estudio, el procedimiento es específico para grupos O-acetilos presentes en el polisacárido Vi de *Salmonella enterica* serovar Typhi, tanto libres como formando glicoproteínas. El intervalo de concentraciones estudiado resultó ser lineal, las evaluaciones realizadas demostraron que el procedimiento fue exacto y preciso en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

El cumplimiento de estos criterios de estandarización es esencial para la aceptación regulatoria y la aplicación confiable de métodos en el control de calidad y desarrollo de vacunas, asegurando que los resultados generados sean consistentes y comparables sin importar el analista ejecutor. Este nivel de control metodológico contribuye a la reproducibilidad científica y la

confianza en los datos obtenidos durante el desarrollo de candidatos vacunales.

Conflicto de intereses. Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría. Félix Cardoso-San Jorge participó en la conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, visualización, redacción (borrador original) y revisión/edición; Elsa D Rey Contreras participó en la investigación, visualización; Bárbara Baró-Vicet curación de datos, investigación y visualización; Jean P. Soubal-Mora participó en la investigación, visualización; Raine Garrido Arteaga participó en la conceptualización, en la investigación, visualización; Jessy Pedroso-Fernández participó en el análisis formal, metodología, redacción (borrador original), revisión y visualización; Sonsire Fernández-Castillo participó en la conceptualización, en la investigación y visualización; Yury Valdés Balbín participó en la conceptualización, en la investigación y visualización. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

Referencias

- Abreu-Vázquez, J. C., Pérez-Herrera, J. Z., & Merchán-Miliá, A. Y. (2025). Validación del método colorimétrico de bifenilo para la determinación del contenido de carbohidratos en el polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 5. *VacciMonitor*, 34. <https://vaccimonitor.finlay.edu.cu/index.php/vaccimonitor/article/view/9245>
- Borman, P., & Elder, D. (2017). Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. ICH quality guidelines: an implementation guide, 127-166. <https://doi.org/10.1002/9781118971147.ch5>
- CECMED (Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos de Cuba). (2014). Resolución CECMED No. 40/2014: Anexo No. 1 de las Buenas Prácticas para Laboratorios de Control de Medicamentos, Validación de Métodos Analíticos. La Habana: CECMED; 2014. <https://www.cecmeced.cu/reglamentacion/aprobadas/resolucion-cecmeced-40> Consultado: 21/04/2025.
- Dalal, J., Rana, R., Harale, K., Hanif, S., Kumar, N., Singh, D., & Chhikara, M. K. (2019). Development and pre-clinical evaluation of a synthetic oligosaccharide-protein conjugate vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroup C. *Vaccine*, 37(36), 5297-5306. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.053>
- Espinosa-Viñals, C., Soroa-Millán, Y., Martín-García, Y., Pérez-Baños, A., Nicot-Valenciano, M., Rodríguez-Noda, L *et al.* (2015). Validación y aplicación de un ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG contra polisacárido capsular Vi de *Salmonella Typhi*. *VacciMonitor*, 24(1), 21-32. <https://vaccimonitor.finlay.edu.cu/index.php/vaccimonitor/article/view/13>
- Garay, J. J. G., Rodríguez, E. W. M., & Rosales, D. D. R. (2025). Epidemiología de casos sospechosos de fiebre tifoidea de 2020 a 2022. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 8(2), 171-176. DOI: <https://doi.org/10.5377/alerta.v8i2.19199>
- García Martínez, E. M. (2012). Aplicación de la ley de Lambert-Beer en espectroscopía UV-visible. <https://riunet.upv.es/handle/10251/16360>
- Hestrin, S. (1949). The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *Journal of Biological Chemistry*, 180(1), 249-261. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)56740-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)56740-5)
- Liu, G., Zhang, X., Cao, Q., Chen, T., Hu, B., & Shi, H. (2025). The global burden of typhoid and paratyphoid fever from 1990 to 2021 and the impact on prevention and control. *BMC Infectious Diseases*, 25(1), 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-025-11223-8>
- Norma Internacional ISO/IEC 17025:2017. (2017). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Tercera edición 2017-11. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30679ef7-3744-4e68-8a8d07e8c2af1c1e/iso-iec-17025-2017>
- Parra TV, Carballo CRR, Torres GR (2021). Validación de un método analítico para la valoración del inyectable liofilizado Amfotericina B. *Revista Cubana de Farmacia*, 54(3). <http://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/633/427>
- Quintana, G., Rondón, M., & Regnault, M. (2019). Validación de un método analítico para la determinación de timerosal en vacunas por espectrofotometría visible. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 82(1 y 2), 79-96. http://levinfogobierno.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff/article/view/17065 Consultado: 21/04/2025
- Robbins JB, Schneerson R. (2008). Conjugate vaccines for bacterial capsular polysaccharides. En: *Vaccines*. 5th ed. (pp. 577–92) Elsevier.
- Walfish, S. (2006). Analytical methods: a statistical perspective on the ICH Q2A and Q2B guidelines for validation of analytical methods. *BioPharm International*, 19(12), 1-6. <https://www.biopharminternational.com/view/analytical-methods-statistical-perspective-ich-q2a-and-q2b-guidelines-validation-analytical-methods>
- WHO (World Health Organization). (2023). Fiebre tifoidea. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/typhoid> Consultado: 26/08/2025.
- WHO (World Health Organization). (2013). Guidelines on the quality, safety and efficacy of typhoid conjugate vaccines. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/typhoid-conjugate-vaccines-annex-3-trs-no-987> Consultado: 26/08/2025