

La técnica de Western Blot aplicada a la vacuna antimeningocócica VA MENGOC BC[®]

Western Blot technique applied to VA MENCOC BC[®] antimeningococcal vaccine

R. Rosario Diéguez Castro^I; Yanin Muñoz Trujillo^{II}; Mirta Castiñeira Díaz^{III}

^I Licenciada en Química. Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Instituto Finlay. La Habana, Cuba.

^{II} Licenciada Química. Máster en Ciencias Químicas. Cuba Farmacia, La Habana, Cuba.

^{III} Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se desarrolló y validó la técnica de Western Blot aplicada a la vacuna antimeningocócica VA MENGOC BC[®] producida en el Instituto Finlay con el objetivo de demostrar criterio de identidad. Con el empleo de esta técnica se identificaron las proteínas antigénicas del tipo P₁, P₃, P₅, 70 y 80 K presentes en la vesícula de membrana externa y vacuna final, por lo cual se utilizó como antisuero la gamma antimeningocócica. Los parámetros desarrollados en la validación de la técnica fueron: especificidad, límite de detección, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad y robustez. La técnica de identidad cumplió con los parámetros señalados anteriormente, por lo que se considera validada.

Palabras clave: Técnica de Western Blot, validación del Western Blot, identidad, vacuna antimeningocócica VA MENGOC BC[®].

ABSTRACT

Western Blot technique applied to VA MENGOC BC[®] antimeningococcal vaccine was developed and validated and produced in "Carlos J. Finlay" Institute to demonstrate the identity criterion. Using this technique it was possible to identify antigenic proteins type P₁, P₃, P₅ 70 and 80 K present in the vesicle of external membrane

and final vaccine, thus, we used the antimeningococcal gamma. Parameters developed in validation of this technique included: specificity, detection limit, repetition, average accuracy, reproduction, and strength, identity technique fulfilled with abovementioned parameters, considering like validated.

Key words: Western Blot Technique, Western blot validation, identity, VA MENGOC BC[®] antimeningococcal vaccine.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad antimeningocócica tanto en forma endémica como epidémica continúa siendo un flagelo de la humanidad. Es una infección bacteriana severa que produce meningitis y ocurre cuando el microorganismo ataca las membranas que protege el cerebro (meninges) y la médula espinal, lo que conduce a una septicemia. Constituye uno de los problemas de salud más importantes del mundo.¹

En estos momentos a pesar del desarrollo alcanzado por la terapia antimicrobiana y de la disponibilidad de cuidados intensivos avanzados, la frecuencia de casos fatales son elevados por lo que una profilaxis vacunal se impone.^{2,3}

La vacuna antimeningocócica cubana, VA MENGOC BC[®], está constituida por vesícula de membrana externa (VME) del serogrupo B y polisacárido capsular serogrupo C de *Neisseria meningitidis* adyuvada con hidróxido de aluminio y tiomersal como preservante.⁴

El desarrollo científico alcanzado actualmente en el mundo ha incrementado la exigencia y el rigor en cuanto a los requisitos establecidos en el proceso productivo y el control de los productos biofarmacéuticos destinados a su certificación y aprobación para su comercialización.⁴

La importancia del criterio de identidad para la vacuna, estriba en la identificación de las principales proteínas antigénicas presentes en la VME de *Neisseria meningitidis* serogrupo B como componente principal del producto vacunal.⁵

La técnica de Western Blot se incorpora como un método inmunoquímico para enriquecer los criterios de identidad del componente proteico con propiedades antigénicas en dicha vacuna, con un proceso previo de estandarización, estudio de las mejores condiciones experimentales. El desarrollo del método y como aspecto fundamental la validación del método es como requisito para la certificación de la vacuna.^{5,6}

MÉTODOS

Equipos e instrumentos de medición: Balanza analítica, medidor de pH digital, pipeta automática 20-200 y de 100-1 000 µL

Muestras: vacuna VA MENGOC BC[®] desabsorbida, lote 7012 la cual se encuentra certificada con los respectivos controles de calidad establecidos en su especificación.

- VME lote 9004: fue evaluada a través de los ensayos de control de calidad establecidos en su especificación.

Reactivos (Calidad USP): acrilamida, N',N' metilendaicrilamida (bisacrilamida), tris-(hidroximetil)-aminometano, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, dodecil sulfato de sodio, persulfato de amonio, glicerol, β mercaptoetanol, glicina, 2-butanol, N,N,N',N' tetrametilendiamina (TEMED), leche descremada, metanol, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de sodio, cloruro de sodio, fosfato monobásico de potasio, cloruro de potasio, peróxido de hidrógeno, diaminobencidina, tween 20, agua, conjugado avidin-horseradish peroxidase (BioRad) para revelar el patrón de proteínas biotiniladas de diferentes pesos moleculares, conjugado anti IgG-ratón-peroxidasa (sigma), conjugado anti IgG (específico para Fc)-peroxidasa (sigma)

Técnica: La determinación inmunoquímica cualitativa se realizó a partir del método de Western Blot según los procedimientos iniciales establecidos en el laboratorio.

La electroforesis se realizó en las mismas condiciones descritas ya en el Procedimiento Normalizado de Operación (PNO 12-114) establecido en el Laboratorio de Inmunoquímica de la Dirección de Calidad del Instituto. Se utilizó un sistema de geles discontinuos con un gel separador del 12,5 %. Las muestras se ajustaron a 1 mg/mL con agua purificada y tratadas posteriormente con solución de tratamiento (tris-HCl 0,1 M pH 6,8, β mercaptoetanol 1 %, SDS 2 %, glicerol 0,1 %, bromofenol azul 0,1 %) en una relación 1:1. Se calentaron las muestras a 100 °C durante 5 min. Se aplicaron 10 µL y se efectuó la corrida a 35 mA, 200 V y 60 Watt durante 1 h.

Una vez concluida la electroforesis, se continuó con los pasos establecidos para el desarrollo de la técnica del Western Blot. Las proteínas sin teñir se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm a 350 mA durante 2 h con una solución tris 0,02 mol/L glicina 0,15 mol/L SDS 0,1 % pH 8,3.

El bloqueo se efectuó con leche descremada al 3 % en solución fosfato (fosfato sodio dibásico 0,08 mol/L, cloruro de sodio 1,37 mol/L, dihidrógeno fosfato de potasio 0,015 mol/L, cloruro de potasio 0,27 mol/L pH 7,2) diluido 10 veces, durante 1 h a 37 °C.

Luego de los lavados con el mismo buffer diluido 1/10 se incubó con el anticuerpo (gamma antimeningocócica en solución de leche descremada al 1,5 % en solución fosfato (1/10) tween 20 0,1 %. Se repiten los lavados y posteriormente se incubó por espacio de 2 h en una solución de leche descremada 1,5 % con el conjugado adecuado (conjugado anti IgG humana-peroxidasa). Se reveló con el sistema diaminobencidina (DAB)-H₂O₂ y el patrón de PM biotinilado se reveló con el conjugado avidin-horseradish peroxidasa.

Como factor crítico en la validación de la técnica de Western Blot para la vacuna VA MENGOC BC[®] se consideró la temperatura del laboratorio durante la incubación de las membranas de nitrocelulosa con el antisuero de inmunoglobulina antimeningocócica humana, con el conjugado anti IgG humana (específico para fragmento Fc)-peroxidasa y el revelado con el sustrato valorado.

Validación del método de Western Blot: se elaboró la documentación requerida para la validación con la confección del Protocolo de Validación del ensayo según la metodología establecida en el Protocolo Maestro de Validación de Métodos Analíticos (PMV-002) desarrollado en el Instituto Finlay. En nuestro caso se evaluaron los parámetros especificidad, límite de detección, precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad) y robustez. En el caso de la precisión intermedia se trabajó con los mismos reactivos, equipos, condiciones de laboratorio, en días diferentes y soluciones preparadas por 2 analistas del mismo laboratorio. En la reproducibilidad los analistas de diferentes laboratorios trabajaron con soluciones, equipos, reactivos, condiciones de laboratorio diferentes y días diferentes.

De acuerdo con las regulaciones internacionales actuales (Normas ICH, USP 30) en el caso de la validación de una técnica de identidad, solo se requiere el estudio de especificidad, aunque en la regulación 41 del CECMED relacionada con la validación de métodos analíticos se incorpora el límite de detección y la robustez. No obstante, en el Protocolo de Validación diseñado se incluyó por las características de la técnica parámetros como la precisión, los cuales aportan una información mayor del desarrollo de la técnica.

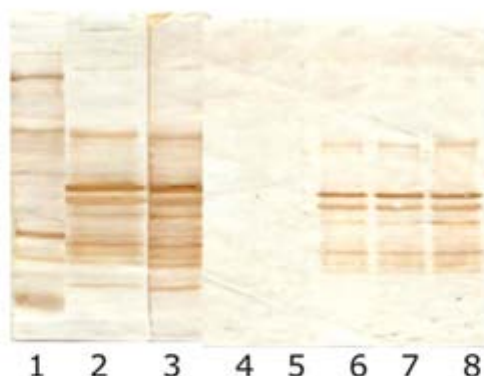
RESULTADOS

La técnica de Western Blot diseñada para determinar criterio de identidad en el control de calidad de la vesícula y vacuna final VA MENGOC BC[®], se ajusta a las condiciones de trabajo del laboratorio y los resultados obtenidos cumplieron con los objetivos para los cuales fue diseñada: el estudio de identidad establecido en las especificaciones de calidad de dichos productos.

Se confeccionó el Informe de Validación del estudio realizado donde se presentan los resultados obtenidos en el estudio de cada parámetro y las recomendaciones a seguir.

Especificidad

Los resultados fueron satisfactorios, pues no se detectaron otras bandas presentes en la VME y en el producto final que no fueran las que se corresponden con el patrón de bandas de proteínas inmunoquímicas características ([fig. 1](#)). Esto demostró la especificidad del método para el estudio de las proteínas de interés (P₁, P₃, P₅, 70 y 80 K).

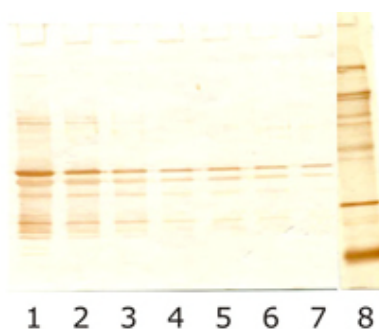


1: patrón de pesos moleculares; 2 y 3: VME; 4 y 5: polisacárido C;
6, 7 y 8 : producto final.

Fig. 1. Western Blot del estudio de la especificidad en la vacuna.

Límite de detección

Teniendo en cuenta los resultados del estudio del Límite de detección en la visualización de cada una de las proteínas fundamentales presentes en la VME, puede plantearse que el valor mínimo de concentración total de proteínas aplicadas donde se obtiene el patrón completo de bandas característico, se encuentra a 2 μg , valor relativamente alejado del de 5 μg que se aplica normalmente, lo que posibilita una adecuada determinación de las proteínas presentes en la muestra con la consecuente reducción en la cantidad de muestra a aplicar sin afectar los resultados ([fig. 2](#)).



1. VME (5 μg); 2.VME (2 μg); 3. VME (1 μg); 4. VME (0,5 μg); 5.VME (0,25 μg);
6. VME (0,12 μg); 7. VME (0,06 μg); 8. patrón PM.

Fig. 2. Western Blot del estudio del límite de detección.

Precisión. Repetibilidad

En los resultados del análisis de la repetibilidad para el caso de la VME como de la vacuna final, se observó que en las 7 réplicas de la misma muestra aplicada en las mismas condiciones en el mismo gel, se mantiene el patrón proteico de forma cualitativa en cuanto a las bandas proteicas inmunogénicas con igual intensidad y posición electroforética con respecto a el patrón de pesos moleculares utilizado

(figs. 3 y 4), lo que demuestra que es un método confiable para el estudio de la identidad de la vacuna al lograrse una repetibilidad adecuada intermuestras.



Fig. 3. Western Blot de la evaluación parámetros de precisión en la VME.

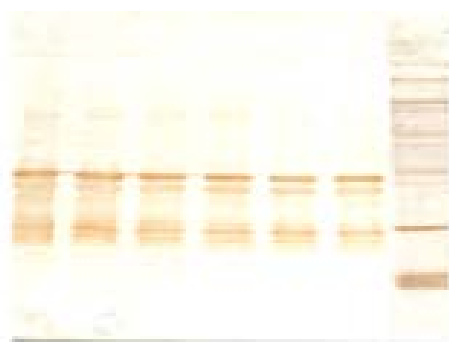


Fig.4. Western Blot para la determinación de la influencia de la temperatura en el resultado del estudio

Precisión intermedia

Los resultados de la precisión intermedia en la evaluación de la posición y la intensidad de cada una de las proteínas que componen la muestra en todos los ensayos realizados (7), indicaron que no existen diferencias significativas entre los analistas de un mismo laboratorio cuando se analizan la VME y la vacuna final.

Reproducibilidad

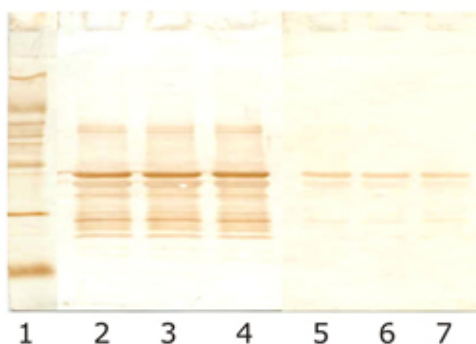
Los resultados de la reproducibilidad entre analistas de diferentes laboratorios mostraron un comportamiento similar al obtenido en el análisis de la precisión intermedia entre analistas de un mismo laboratorio tanto en el estudio de la vesícula como en la vacuna.

Por obtenerse iguales resultados en los estudios de los parámetros de precisión intermedia como de reproducibilidad a los correspondientes al estudio de

repetibilidad, por ajustes editoriales, se justificaron los resultados con las mismas figuras 3 y 4 para el estudio de estos parámetros en la vesícula y vacuna respectivamente.

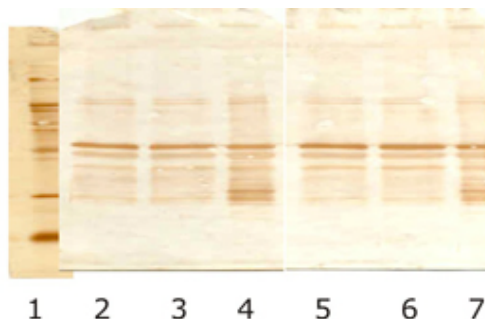
Robustez

Al analizar el efecto de la temperatura en la identificación de las proteínas presentes en la VME durante los procesos de incubación de las membranas de nitrocelulosa con los anticuerpos presentes en la gamma antimeningocócica hasta el revelado, se demostró que este factor influye en la determinación. En el intervalo de temperatura entre 27-29 °C, el patrón de bandas característico sufrió alteraciones por cuanto todas las bandas en general resultaron tenues e incluso desaparecen las de menor contenido de proteína (fig. 5). Si embargo, para el análisis del producto final se obtuvo un patrón similar en cuanto a la posición e intensidad de las bandas de proteínas al obtenido para el rango entre 18-22 °C (fig. 6).



VME: 1. patrón PM; 2, 3 y 4. (18 -22 °C); 5,6 y 7. (27 -29 °C).

Fig. 5. Western Blot para la determinación de la influencia de la temperatura en el resultado del estudio de la VME.



Producto final: 1. patrón PM; 2, 3 y 4 producto final (18 -22 °C);
5, 6 y 7 producto final (27-29 °C).

Fig. 6. Western Blot para la determinación de la influencia de la temperatura en el resultado del estudio de la vacuna.

DISCUSIÓN

La especificidad del método se determinó a través de la detección de posibles bandas inmunoquímicas que se correspondiera con otros contaminantes no proteicos (polisacáridos) teniendo en cuenta que ese polisacárido es un componente de la vacuna final. Este resultado se logró ya que el porcentaje en que se confeccionó el gel (12,5 %) no permite el paso de los polisacáridos por su elevado peso molecular a través del enrejado del mismo.

La posibilidad de visualización del patrón de bandas esperado en el estudio tanto de la vesícula como de la vacuna para concentraciones desde 2 hasta 5 µg, permite una alternativa para aquellos controles en los cuales no se disponga de suficiente cantidad de muestra.

La comprobación del estudio de la repetibilidad demuestra la confiabilidad del método al lograrse resultados repetibles, lo cual constituye una garantía en el estudio de identidad del producto.

Los resultados obtenidos en el estudio de la precisión intermedia, demostró como con las mismas condiciones ambientales de laboratorio, reactivos, equipamiento, con soluciones preparadas por cada analista y trabajando en días diferentes, no se reportó diferencias que afecten el resultado de la identidad del producto.

El estudio de reproducibilidad permitió afirmar que aun cuando los juegos de reactivos y equipos para cada laboratorio presentan algunas diferencias como proceder de diferentes proveedores, existir diferentes condiciones ambientales y trabajar en diferentes días, no repercutieron para la evaluación de la identidad de la vesícula y la vacuna.

Estos resultados demostraron la influencia de la temperatura en los procesos de incubación de las membranas en el tiempo de bloqueo, en la incubación con los anticuerpos de la gamma antimeningocócica, con el conjugado y con el sustrato en la técnica de Western Blot y su repercusión en aquellas proteínas que son más concentradas como es el caso de la VME con respecto a la concentración proteica en la vacuna final, por lo que se recomienda el mantenimiento de la temperatura en el último rango, es decir, entre 18-22 °C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Frasch CE, Peppler MS. Protection againts Group B Neisseria meningitidis disease: Preparation of Soluble Protein and Protein-Polysaccharide Immunogens. *Infection and Inmunity*. 37(1):272-80(1982).
2. Robbins JB. Vacunas para la prevención de enfermedades bacterianas encapsuladas: Problemas y perspectivas futuras: *Inmunoquímica*. 15:839-854 (1978).
3. Zollinger WD. New and Improved vaccine againts meningococcal disease. New generation vaccine. Dekker Inc. New York. p. 325-348 (1990).
4. Campa C, Sierra VG, Gutiérrez M, Sotolongo F, Garcia L, Bidet G, San pedro MC, Galgueras M. Método para obtener una vacuna con amplio rango de espectro

protector contra la *Neisseria meningitidis* serogrupo B, la vacuna resultante, la gamma y el factor de transferencia, Cuba, patente No. 125(1987).

5. Estrada E y col. Optimización del Western Blot y aplicación en el estudio de la inmunogenicidad de las proteínas de la vacuna antimeningocócica cubana VA MENGOC BC. Trabajo de determinación de residencia en inmunología. Instituto Finlay.C. Habana. (1995).

6. Puido A, Ruisanchez I, Boqué R, Ruis FX. Western Blot como método analítico de control. *Analytical Chim Acta*. 455, 267(2002).

Recibido: 2 de marzo de 2009.

Aprobado: 7 de abril de 2009.

Lic. *R. Rosario Diéguez Castro*. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Calle 17 No. 19 805, La Coronela, La Lisa, CP 11600, La Habana, Cuba.