

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES DEL SIDA (LISIDA)

Estudio de estabilidad del sistema ELISA DAVIH AgP24

Kenia Romero Martínez,¹ María T. Pérez Guevara,² Anitza Fragas Quintero,³ Yulianne Peña Orta³ y Maricela Izquierdo Márquez⁴

RESUMEN

OBJETIVO: para extender el tiempo de vida útil del sistema ELISA DAVIH-AgP24, se realizó una prueba de estabilidad en anaquel. **MÉTODOS:** el estudio se realizó durante 12 meses, con 3 lotes consecutivos del diagnosticador. El protocolo a seguir fue ensayar la curva de calibración del control positivo, según las instrucciones de uso del sistema. Se controlaron los requisitos de calidad de cada uno de los reactivos de acuerdo con sus especificaciones. Se estudió la normalidad de los valores obtenidos en cada uno de los puntos de la curva en los meses estudiados y la homogeneidad de las medias y las varianzas utilizando como criterios de aceptación las dóxicas de Grubbs y de Cochran, respectivamente. Para la precisión del ensayo, se realizó un análisis de cada uno de los puntos de la curva en los meses 1, 4, 7 y 9, mediante la utilización de cartas de control (gráficas de Levy-Jennings), estableciendo como límites ± 2 desviaciones estándar. **RESULTADOS:** los requisitos de calidad de cada componente cumplieron con las especificaciones hasta el noveno mes, a partir del cual se apreciaron cambios en las características organolépticas del cromógeno tetrametilbencidina y un deterioro en las características funcionales del sistema, por causa del tampón sustrato; en el resto de los componentes no se observaron cambios. Los valores obtenidos fueron aceptados como normales hasta el noveno mes. Los valores estadísticos de Grubbs y de Cochran observados para los 6 puntos de la curva durante los 9 meses analizados fueron menores que los valores críticos tabulados para $\alpha=5\%$, por lo que se concluyó que existe homogeneidad entre medias y varianzas. En los gráficos de Levey-Jennings los valores se mantuvieron dentro de los límites establecidos. **CONCLUSIONES:** estos resultados permitieron extender el período de validez del sistema hasta 6 meses, con 50 % de cobertura.

Palabras clave: estudios de estabilidad, diagnóstico de AgP24, ELISA/métodos.

INTRODUCCIÓN

La estabilidad de los diagnosticadores se debe considerar desde 2 puntos de vista; primero el establecimiento del período de tiempo en el cual cada componente cumplirá con las especificaciones químicas, físicas y biológicas dentro del envase en el cual se comercializa, y segundo, el programa permanente a través del cual el fabricante monitorea o controla la estabilidad del producto en la etapa poscomercialización.¹ La estabilidad es establecida en la etapa de investigación, antes de la comercialización y durante la

producción se mantiene el programa de control de la estabilidad.² El estudio de estabilidad es un paso indispensable en el proceso del diseño de los diagnosticadores, porque permite definir el período de validez, como requisito esencial para la comercialización de estos productos, incluido un margen de seguridad adecuado.³

Los estudios de estabilidad que se realizan en la etapa de normalización de un diagnosticador posibilitan establecer un período de validez para el producto. En estos estudios se comprueban las especificaciones de calidad: propiedades organolépticas, las características físico-químicas,

¹ Licenciada en Bioquímica. Máster en Ciencias. Investigadora Agregada. Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA), La Habana, Cuba.

² Licenciada en Bioquímica. Máster en Ciencias. Investigadora Auxiliar. LISIDA, La Habana, Cuba.

³ Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a Investigadora. LISIDA, La Habana, Cuba.

⁴ Licenciada en Biología. Máster en Ciencias. Investigador Auxiliar. LISIDA, La Habana, Cuba.

biológicas y microbiológicas de todos los componentes que conforman el estuche, así como su estabilidad en el envase primario en las condiciones de almacenamiento establecidas por el productor.^{4,5}

En el proceso de registro del diagnosticador, los resultados del estudio de estabilidad de los componentes del sistema diagnóstico permiten solicitar un período de validez provisional, durante el cual puede ser utilizado el diagnosticador con absoluta seguridad y eficacia. En la etapa de posregistro se realizan estudios de estabilidad de vida de estante cuando:

- Se pretende confirmar o ampliar (o ambos) el período de validez inicial para establecer un período de validez definitivo para el producto.
- Se realizan cambios mayores en la formulación de algunos de los componentes o de las condiciones de envase.⁶

El diagnosticador DAVIH-AgP24, producido por Laboratorios DAVIH, es un sistema inmunoenzimático de tipo *sandwich* que utiliza anticuerpos monoclonales de origen murino contra la P24 como sistema de captura, y anticuerpos policlonales

específicos contra la proteína 24 del VIH-1 conjugado con peroxidasa para la detección.

Para el revelado de la reacción se utiliza como cromógeno la tetrametilbencidina y la placa se lee a una longitud de onda de 450 nm en un lector de ELISA (LABSYSTEM). Comprende un rango de detección entre 514-16 pg/mL de proteína 24 (p24). Este sistema se emplea para la detección de la proteína 24 en suero, plasma o sobrenadante de cultivo, de ahí su uso en el monitoreo y seguimiento de la terapia antirretroviral en pacientes infectados por VIH-SIDA y en el diagnóstico perinatal de niños nacidos de madres seropositivas.⁷

Con el objetivo de extender el tiempo de vida útil del diagnosticador DAVIH-AgP24 se realizó un estudio de estabilidad en anaquel en tiempo real durante 12 meses.

MÉTODOS

Diagnosticador

Se empleó el sistema ELISA DAVIH-AgP24 (Laboratorios DAVIH, La Habana, Cuba), conformado por 10 componentes, los cuales se enuncian en la tabla 1.

TABLA 1. Componentes y especificaciones de calidad del sistema DAVIH-AgP24

Componentes	Características físicas Características organolépticas (inspección visual)			Características químicas	
	Presentación	Color	Transparencia	Requisito	Método de ensayo
<i>R1- Microplaca de 96 pozos sensibilizados</i>	Microplaca de 6 tiras de 16 pocillos	Incoloro	Sí	No procede	No procede
<i>R2- Solución de lavado 25X</i>	Líquido	Ligeramente amarillo	Sí	7,2 a 7,4	Medición del pH
<i>R3- Tampón de ruptura</i>	Líquido	Incoloro	Sí	No procede	No procede
<i>R4- Control Positivo</i>	Masa seca y porosa en forma de polvo o pastilla	Blanco o ligeramente amarillo	No	Mayor o igual que 1,000	DAVIH-AgP24
<i>R5- Control Negativo</i>	Líquido	Naranja o amarillo	Sí	Menor o igual que 0,150	DAVIH-AgP24
<i>R6- Diluyente de conjugado</i>	Líquido	Ligeramente amarillo	Sí	No procede	No procede
<i>R7- Conjugado</i>	Líquido	Ligeramente pardo	Sí	Título: 5×10^{-4}	DAVIH-AgP24
<i>R8- Cromógeno TMB</i>	Líquido	Incoloro o ligeramente verde	Sí	No procede	No procede
<i>R9- Tampón sustrato</i>	Líquido	Incoloro	Sí	5,0 a 5,1	Medición del pH
<i>R10- Solución paralizadora</i>	Líquido	Incoloro	Sí	No procede	No procede

Lotes y condiciones de almacenamiento

Se incluyeron 3 lotes consecutivos de 3 estuches cada uno. Los lotes fueron aprobados por el Laboratorio de Control de la Calidad del centro, por cumplir con las especificaciones de calidad establecidas para este producto. Se almacenaron de 2 a 8 °C, manteniendo en sus envases primarios cada uno de los componentes hasta el momento de su uso. El tiempo de estudio de los lotes fue de 12 me-ses y los muestreos se realizaron en los meses 1, 4, 7, 9 y 12.

Ensayos

En cada muestreo antes de comenzar el ensayo se comprobaron las características físicas de los 10 componentes, se observó su presentación y el volumen en su envase primario en la que se utilizó como método de ensayo, la observación visual y la verificación del volumen por la medición de este con pipetas automáticas o cilindros graduados de acuerdo con el componente. Dentro de las características físicas se incluyeron las características organolépticas: color y transparencia que se comprobaron por inspección visual. Se comprobó además la no formación de precipitados en la solución de lavado 25X.

En el control positivo se observaron las características del producto liofilizado y después de reconstituido. Las características químicas de los controles positivo, negativo y el conjugado se chequearon con la realización del ensayo y se comprobó en cada lote que estos componentes cumplieran con los límites de aceptación establecidos. En la solución de lavado 25X y el tampón sustrato se verificó el pH por medición en un pHmetro HANNA 211, comprobando si se cumplió con el rango establecido en la especificación. En este estudio de estabilidad no se analizó la calidad microbiológica de los componentes por ser un indicador no controlado.

El protocolo a seguir en el estudio de estabilidad fue ensayar la curva patrón del sistema que se obtiene a partir de diluciones seriadas de base 2 del control positivo, que abarca un rango de concentración de P24 desde 514 pg/mL hasta 16 pg/mL. Se incluyeron además 2 réplicas del control negativo por ensayo, para el resto de las etapas en el ensayo se siguieron estrictamente las instrucciones de uso del diagnosticador (Laboratorios DAVIH, La Habana, Cuba).

Las características funcionales del sistema se midieron por el resultado final, que es considerado válido cuando las densidades ópticas (DO) de las réplicas del control positivo son mayores o iguales que 1,00 y las DO de al menos 2 réplicas del control negativo son menores o iguales que 0,150, establecidos por el productor como límites de aceptación en el manual de instrucción del estuche.

Análisis de resultados

Se determinó la media (\bar{x}) y la desviación estándar (DE) de los valores de DO obtenidos para los puntos de la curva patrón en los 3 lotes de estabilidad. Se analizó cada uno de los puntos de la curva mediante la utilización de cartas de control (gráficas de Levey-Jennings) para el seguimiento de la precisión, se estableció como límite de control ± 2 DE en los meses 1, 4, 7 y 9, según lo descrito por *Jacobson*.⁸ Los valores de DO correspondientes a cada punto de la curva patrón referente a la concentración de P24 se compararon por las dúcimas de Grubbs, para estimar la normalidad de los datos obtenidos para cada punto de la curva y de *Cochran*,⁹ así como la homogeneidad entre las varianzas de los 3 lotes estudiados con un nivel de confianza de 95 % en ambos casos. Para el análisis estadístico y la confección de los gráficos se empleó el programa Excel de Microsoft Office 2003.

RESULTADOS

En el sistema DAVIH-AgP24, las características organolépticas cumplieron las especificaciones en los 10 componentes del estuche hasta el noveno mes, a partir del cual se apreciaron cambios en la coloración del cromógeno tetrametilbencidina (TMB) y un deterioro en las características funcionales del sistema por causa del tampón sustrato (cambio del pH), pues los controles positivo y negativo no cumplieron con los límites de aceptación establecidos. En el resto de los componentes no se observaron cambios. El pH de la solución de lavado, durante los 12 meses estudiados, cumplió con el intervalo establecido en las especificaciones de calidad para cada componente.

Se estudió la normalidad de los resultados observados para cada punto de la curva en cada uno de los meses y todos los valores fueron aceptados hasta el noveno mes.

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados de los estadígrafos para la Dócima de Grubbs ($G_{\text{máx}}$ y $G_{\text{mín}}$) y para la dócima de Cochran (C), que en todos los casos resultaron ser menores que el valor crítico para $\alpha=5\%$.

TABLA 2. Análisis de la homogeneidad entre las medias

Concentración (pg/mL)	\bar{x}	DE	$G_{\text{máx}}$	$G_{\text{mín}}$
514	2,311	0,715	0,963	1,034
257	1,404	0,390	0,856	1,102
128	0,832	0,205	0,858	1,09
64	0,509	0,132	1,053	0,954
32	0,333	0,076	0,763	1,144
16	0,203	0,055	1,145	0,800

G: estadígrafo para la dócima de Grubbs. Valor crítico de la tabla de Grubbs para $n=3$ 1.155 para $\alpha=5\%$.

TABLA 3. Análisis de la homogeneidad entre las varianzas

Concentración (pg/mL)	(Lote 1) DE ²	(Lote 2) DE ²	(Lote 3) DE ²	C
514	0,014	0,304	0,349	0,523
257	0,038	0,229	0,108	0,610
128	0,012	0,093	0,022	0,732
64	0,005	0,022	0,007	0,647
32	0,014	0,011	0,007	0,437
16	0,0008	0,010	0,001	0,847

C: Estadígrafo para la dócima de Cochran. Valor crítico de la tabla de Cochran para $p=4$ y $n=3$ 0,768 para $\alpha=5\%$.

En la figura se muestran los gráficos de control de Levey-Jennings, donde se analizan los resultados de DO de los 6 puntos de la curva al mes, 4 meses, 7 meses y 9 meses de los 3 lotes ensayados.

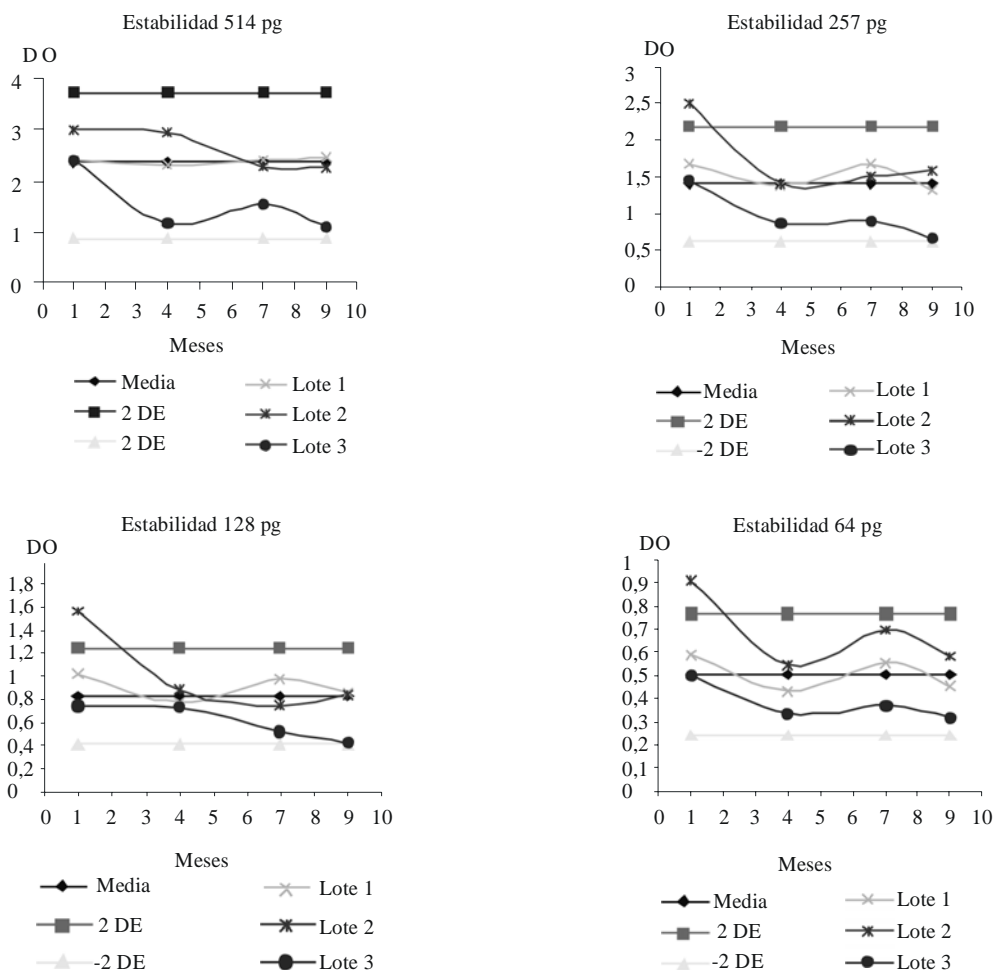


Fig. Gráficos de control de Levey-Jennings para los 6 puntos de la curva al mes, 4 meses, 7 meses y 9 meses en los 3 lotes estudiados.

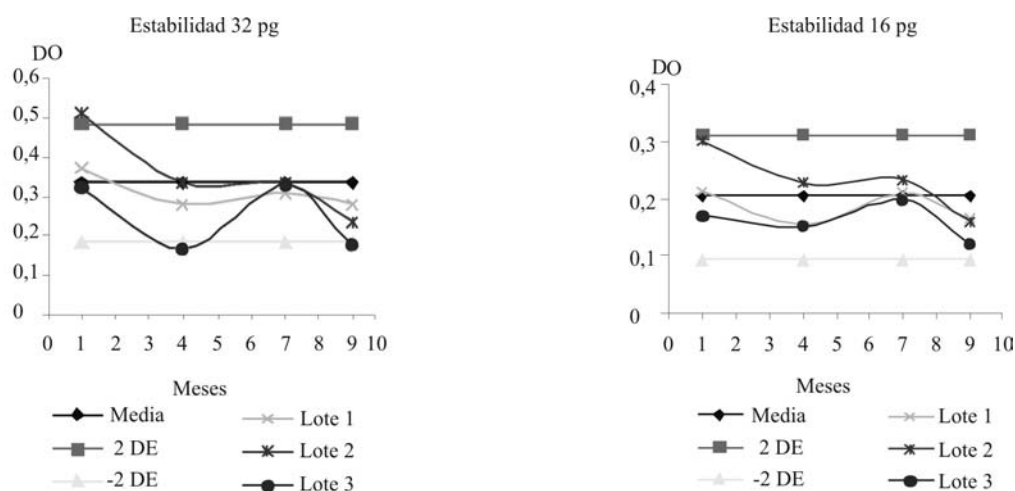


Fig. Gráficos de control de Levey-Jennings para los 6 puntos de la curva al mes, 4 meses, 7 meses y 9 meses en los 3 lotes estudiados (Continuación).

DISCUSIÓN

Los estudios de estabilidad son una serie de ensayos que permiten obtener información, para establecer el período de validez de un producto en su envase original y en las condiciones de almacenamiento especificadas, durante el cual este conserva su calidad, seguridad y eficacia.³

Como parte de la evaluación de los índices físico-químicos susceptibles de cambiar durante el tiempo de almacenamiento y que pueden influir en la calidad, seguridad y eficacia del producto, se observaron las características organolépticas y se determinaron las características químicas, dadas por el pH y la DO en los casos que procede.³

El sistema ELISA DAVIH AgP24 tenía inicialmente un período de validez de 4 meses, dado por los estudios de estabilidad realizados para el registro del diagnosticador.⁶

Al estudiar la estabilidad para extender el período de validez del sistema, el cromógeno tetrametilbencidina (TMB) presentó cambios en su coloración y el tampón sustrato en su composición química, esto impidió una reacción efectiva entre la enzima y el sustrato, lo cual influyó negativamente en la sensibilidad del sistema. El soluto que conforma el cromógeno tetrametilbencidina es fotosensible, lo que puede influir en el cambio de color cuando conforma la solución con el metanol,

además la pérdida de las características organolépticas para este producto coinciden con el período de validez que muestra la especificación. En otros estuches comerciales cuyo reactivo cromogénico es la tetrametilbencidina (TMB) utilizan como material de envase frascos ámbar que evitan su deterioro por contacto con fuentes de luz, a diferencia de los nuestros, que se envasan en frascos plásticos blancos. Estos requerimientos de envase son utilizados en la industria medicofarmacéutica para productos que son fotosensibles.¹⁰

Ortiz y otros, así como Jacobson,^{1,8} señalan que entre los factores que pueden reducir la exactitud analítica de un ensayo¹ se encuentran la calidad del agua que se emplea en la preparación de las soluciones tampón, así como el pH y la fuerza iónica que alcanzan. Es por ello que al variar el rango de pH establecido por el fabricante para el tampón sustrato, el sistema no alcanzó la sensibilidad requerida y no cumplió con los parámetros establecidos que lo califican como un ensayo válido. Este resultado obtenido, a la vez confirma el período de validez con que contaba el componente, donde solo hasta los 9 meses está confirmada su funcionalidad.

Para un nivel de confianza de 95 %, la dócima de Grubb indicó que existe homogeneidad entre las medias y la dócima de Cochran mostró homogeneidad entre las varianzas,⁶ excepto para el punto

de la curva correspondiente a 16 pg/mL, donde el valor de C fue superior al valor crítico tabulado para $\alpha=5\%$, pero inferior al valor que corresponde a $\alpha=1\%$ (0,864), por lo que no se considera un valor errático, sino rezagado.¹¹ Este punto se corresponde con el límite de detección del sistema, y en la medida que van disminuyendo los valores de DO, aumenta la dispersión en los datos y, por tanto, la desviación estándar aumenta.¹²

En los gráficos de control para cada uno de los puntos de la curva (fig.), se observó que la mayoría de los valores se encuentran distribuidos dentro del intervalo de ± 2 DE respecto a la media de los 3 lotes, estos límites son considerados por *Jacobson*, junto a *Paweska* y otros.^{8,13} como el intervalo en el que se deben distribuir los resultados, que muestran una menor dispersión y en correspondencia una mayor precisión del ensayo. Los puntos que quedan fuera de los límites de control no constituyen resultados erróneos si se tiene en cuenta que se está trabajando con 95 % de confianza, por lo que queda una probabilidad de 5 % de que existan valores fuera del rango por errores aleatorios, o sea, debidos al azar.¹²

Los resultados obtenidos demostraron que en las condiciones de estudio empleadas, las características organolépticas, físico-químicas y funcionales se mantuvieron durante 9 meses, lo cual comprueba que el sistema mantiene su funcionalidad durante este período y que la temperatura de almacenamiento especificada garantiza su conservación. Estos resultados permitieron extender el período de validez del sistema ELISA DAVIH-AgP24 hasta 6 meses con 50 % de cobertura.

Stability study of ELISA DAVIH-p24 Ag

ABSTRACT

OBJECTIVE: With the objective of extending useful lifetime of ELISA DAVIH-p24 Ag, an on shelf stability test was conducted. **METHODS:** three consecutive batches of the diagnostic kit were studied for 12 months. The applied protocol was to test the calibration curve of the positive control according to the manufacturer's instructions for the system operation. The quality requirements for each reagent, according to their specifications, were controlled. Normality in obtained values for each point of the curve in the analyzed period and also homogeneity of means and variances were studied by using Grubbs' and Cochran's tests, respectively. For the assay precision, each point of the curve was analyzed at 1st, 4th, 7th and 9th months by means of Levy-Jennings' graphs, setting ± 2 standard deviations as limit values. **RESULTS:** the quality requirements of each component met the

specifications up to 9th month; from that moment on, changes in the organoleptic characteristics of tetramethylbenzidine chromogen and deterioration in the operational characteristics of the system were observed due to substrate buffer. The remaining components did not change. The yielded values were accepted as normal up to the 9th month. Grubb's and Cochran's test values for the 6 points of the curve during the nine months were lower than the tabulated critical values for $\alpha=5\%$, so homogeneity between means and variances was confirmed. Levy-Jennings' graphs showed values within the set limits. **CONCLUSIONS:** these results allowed extending the validity period of the system to six months, with 50 % coverage.

Key words: stability studies, p24 antigen diagnosis, ELISA/methods.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ortiz E, Izquierdo M, Pérez MT, Pérez E. Estabilidad en estante del diagnosticador DAVIH-BRU-2. *Rev Salud Anim.* 2005;27(3):159-65.
- Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Buenas Prácticas para la producción de los diagnosticadores. Estabilidad de los diagnosticadores. La Habana, Cuba. Regulación 20; 2004. p. 26-27.
- Norma Cubana. Estudios de estabilidad de diagnosticadores. NC-EN 13640; 2004.
- Stability consideration in dispensing practice. USP XXIX. 1191. USA; 2006.
- Yañez B. Directrices sobre Buenas Prácticas para la fabricación de productos farmacéuticos. III Taller de Procesamiento aséptico en la Industria Biofarmacéutica. Ciudad de La Habana: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED); 2006.
- Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Requisitos generales para el Registro de los Diagnosticadores. La Habana, Cuba: Regulación 8; 2001. p. 1-22.
- Izquierdo M, Silva E, Díaz H, Lubián A, Nibot C, Tabares D. Estudio comparativo de dos sistemas de captura de la proteína de 24 kD del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. *Biocología Aplicada.* 2000;17:102-4.
- Jacobson RH. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev Sci Tsh Int Epiz.* 1998;17(2):507-26.
- Norma Cubana. Guía para la Validación de Métodos de Ensayos Químicos para Alimentos. Anexo A, A 1-3. NC-TS-368; 2004.
- Schupbach J, Tomasik Z, Knuchel M, Opravil M, Gunthard H, Nadal D, et al. Optimized virus disruption improves detection of HIV-1 p24 in particles and uncovers p24 reactivity in patients with undetectable HIV-1 RNA under long-term HAART. *J Med Virol.* 2006;78:1003-10.
- Norma Cubana. Evaluación del funcionamiento de los diagnosticadores. NC-EN 13612; 2005.
- Romero K. Validación del sistema UMELISA HBsAg PLUS utilizando muestras de suero de cordón umbilical [Tesis en opción al título de Máster en Ciencias]. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Cuba; 2008.
- Paweska JT, Potts AD, Harris HJ, Smith SJ, Viljoen GJ, Dungu B, et al. Validation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against *Brucella abortus* in cattle sera using an automated ELISA workstation. *Onderstepoort J Vet Res.* 2002;69:61-77.

Recibido: 2 de mayo de 2008. Aprobado: 25 de septiembre de 2008. Lic. *Kenia Romero Martínez*. Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA). Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. La Habana, Cuba. Correo electrónico: cicdc@infomed.sld.cu