

Validación interlaboratorio del método de SDS-PAGE para la determinación de la composición de proteínas en extractos alergénicos de ácaros

Interlaboratory validation of the SDS-PAGE method for the protein composition determination in house dust mite allergen extracts

Wendy Ramírez González ^{a*} 0000-0001-6349-1116.

Mayté Mateo Morejón ^a 0000-0003-2606-3416.

Raysa Cruz Jiménez ^a 0000-0003-1580-3781.

Eilen Beatriz Macías Ochoa ^a 0000-0002-2958-8667.

Anette García Freijó ^a 0000-0002-1813-7318.

Damaris Torralba Averoff ^a 0000-0002-4212-9203.

Alexis Labrada Rosado ^a 0000-0003-0956-7946.

^a Centro Nacional de Biopreparados, Bejucal, Mayabeque, Cuba.

* anette.garcia@biocen.cu

Recibido: 1 de octubre de 2021;

Aceptado: 10 de diciembre de 2021;

RESUMEN

La Monografía de la Farmacopea Europea para Productos Alergénicos establece la importancia de la determinación de la composición de proteínas a productos finales y también a la Materia Prima Alergénica (MPA) y el Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA). La validación de métodos analíticos asegura la calidad del producto desde sus estadios iniciales. El objetivo de este trabajo fue validar el método de SDS-PAGE para extractos alergénicos de ácaros *Dermatophagoides siboney* (*Ds*) y *Blomia tropicalis* (*Bt*) en las tres etapas del proceso (MPA, IFA y producto final). Participaron en el estudio tres laboratorios de BIOCEN. Se evaluó la Precisión (Repetibilidad, Precisión Intermedia y Reproducibilidad) en la determinación del contenido relativo de las bandas principales que contienen componentes alergénicos. Como parámetro de Especificidad se analizó la posible interferencia del bicarbonato de amonio. Se evaluó la Exactitud y se determinó el Límite de Detección (LD) en la determinación del peso molecular de las bandas principales. Se cumplieron todos los criterios de aceptación establecidos. El método fue preciso, todos los coeficientes de variación (CV) calculados fueron <5% y no hubo diferencias significativas entre los CV comparados mediante la prueba de Fisher, $p > 0.05$. No hubo diferencias significativas entre porcentajes de las bandas principales en los extractos alergénicos con Bicarbonato de Amonio en su composición original según ANOVA, $p > 0.05$. El método fue exacto, no hubo diferencias significativas (Prueba t Student, $p > 0.05$) entre los valores experimentales del peso molecular y los reportados en la literatura. El LD la técnica fue de para MPA *Ds* 5000UB, *Bt* 50000UB; IFA y Producto final de *Ds* 2500UB, *Bt* 12500UB. En conclusión, quedó validada la técnica analítica SDS-PAGE para la determinación de la composición de proteínas en los extractos alergénicos de ácaros en tres etapas diferentes del proceso de fabricación. Se fortalece así el aseguramiento de la calidad de estos productos.

Palabras claves: ácaros; validación; SDS-PAGE; extractos alergénicos.

ABSTRACT

The European Pharmacopoeia Monograph on Allergen Products establishes the importance of protein composition determination to final products and also to the Allergenic Raw Material (ARM) and the Active Pharmaceutical Ingredient (API). Analytical methods validation ensures the quality of the product from its initial stages. The aim of this work was to validate SDS-PAGE method for allergenic extracts of *Dermatophagoides siboney* (*Ds*) and *Blomia tropicalis* (*Bt*) mites in the three stages of the process (ARM, API and final product). Three BIOCEN laboratories participated on this study. Precision (Repeatability, Intermediate Precision and Reproducibility) was evaluated in relative content determination of the main bands that contain allergenic components. As a Specificity parameter of the method, the possible interference of ammonium bicarbonate was analyzed. Accuracy was evaluated and the Limit of Detection (LD) was determined in the molecular weight (MW) determination of the main bands. All established acceptance criteria were met. The method was precise, all the coefficients of variation (CV) calculated were <5% and there were no significant differences between the CVs compared by Fisher's test, $p > 0.05$. There were no significant differences between percentages of the main bands in the allergenic extracts with Ammonium Bicarbonate in its original composition according to ANOVA test, $p > 0.05$. The method was exact, there were no significant differences (t Student test, $p > 0.05$) between the MW experimental values and those reported in the literature. The LD was for MPA of *Ds* 5000UB, *Bt* 50000UB; IFA and Final Product of *Ds* 2500UB, *Bt* 12500UB. In conclusion, the SDS-PAGE analytical technique was validated for the protein composition determination in the house dust mite allergen extracts, in three different stages of the manufacturing process. Thus, the quality assurance of these products is strengthened.

Keywords: Advanced Education, pharmaceutical product, performance testing.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas afectan de forma significativa la calidad de vida de los pacientes (Arias et al., 2018). La Organización Mundial de Alergia (WAO, siglas en inglés) las sitúa como la cuarta enfermedad más importante en el mundo (Escobar y Guaman, 2018). Por estas razones han sido catalogadas como una de las epidemias no infecciosas del siglo XXI (González, 2018). De ellas, el asma, es la de mayor morbilidad y mortalidad (Asamoah et al., 2017; Castro et al., 2020). En Cuba, el asma es considerada como un problema sanitario importante por parte de las autoridades de salud y se considera la enfermedad crónica más común de las enfermedades pediátricas (Castro et al., 2020). La exposición a ácaros del polvo doméstico es reconocida como el factor de riesgo más influyente en la aparición de enfermedades alérgicas, principalmente del asma (Caraballo et al., 2016; Kang et al., 2018). Los ácaros son los agentes sensibilizantes de mayor incidencia en América Latina. En Cuba, los más frecuentes son *Blomia tropicalis* (Bt), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) y *Dermatophagoides siboney* (Ds) (Castro et al., 2020).

La inmunoterapia alérgeno específica (IT) es el único tratamiento para las alergias respiratorias capaz de cambiar el curso de la enfermedad, mejora sustancialmente los síntomas clínicos y reduce el consumo de medicamentos (Asamoah et al., 2017). El Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN) desarrolló tres extractos alérgicos estandarizados de ácaros del polvo doméstico: VALERGEN-DP; VALERGEN-DS y VALERGEN-BT (Labrada, 2008). En 2006 se logró el Registro Sanitario en Cuba como vacunas terapéuticas (inyectables) y posteriormente en el año 2009 fue registrada la vía sublingual; para el tratamiento del asma alérgica. Los productos VALERGEN están actualmente indicados para el tratamiento del asma alérgica, de leve a moderada, asociada a estos ácaros. La producción de estas vacunas parte del cultivo de los ácaros del polvo doméstico en condiciones de laboratorio. El resultado de la propagación de los mismos se define como la Materia Prima Alérgica (MPA). Hasta el momento, la MPA se concibe como el primer producto intermedio en el proceso productivo con especificaciones de calidad definidas y métodos de ensayos. El Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) de los extractos alérgicos de ácaros, es el segundo producto intermedio en el proceso de fabricación de este tipo de producto y lo constituyen los extractos alérgicos a granel de los ácaros del polvo obtenido después de la etapa de filtración esterilizante y antes del proceso de liofilización.

Se entiende por extracto alérgico estandarizado un producto con una composición que refleje adecuadamente la composición natural de la fuente alérgica, con actividad biológica consistente lote a lote, expresada preferentemente en unidades que permitan su comparación con otros productos y que sean informativas desde el punto clínico; así como con estabilidad definida, que sirva de base para el establecimiento de su período de validez (Cardona et al., 2018). Las Unidades Biológicas (UB) fueron introducidas en 1989 por las Guías Nórdicas para el Registro de Preparaciones Alérgicas y se definen como la concentración de alérgeno capaz de introducir un habón del mismo tamaño que una solución de histamina 54,3 mmol/L, en la mediana de 20 pacientes. Tiene vital importancia la caracterización de los extractos según el perfil alérgico, ya que este puede variar en dependencia de la región geográfica en que nos encontremos, y alérgenos que son importantes para una región pueden no serlo para otra, de ahí la importancia de caracterizar el perfil en cada región y/o país, para identificar las proteínas que deben estar presentes en el extracto que se utilice (Larsen y Dreborg, 2020). La técnica de electroforesis en geles de poliacridamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, siglas en inglés) es un método rápido, reproducible y de bajo costo a nivel de muestra. Es ampliamente utilizada para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas (Wiesner et al., 2021). Se emplea actualmente en el laboratorio de Alérgenos de BIOCEN para determinar la composición de proteínas de los extractos alérgicos de ácaros en el producto terminado.

Según la GUIA No. 41-2013 “Validación de Métodos Analíticos” del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), la validación de los métodos analíticos utilizados en las actividades de control desempeña un papel determinante, pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de las materias primas y productos, lo cual contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficiencia de los mismos.

Con el propósito de elevar el actual estándar de calidad de estos productos alérgicos, así como asegurar la calidad del producto final es necesaria la introducción del ensayo de composición de proteínas (SDS-PAGE) como método de control de calidad de la MPA y el IFA y establecer parámetros y límites de aceptación para las tres especies de ácaros. Por estas razones, el **objetivo** de este trabajo fue validar el método de SDS-PAGE para extractos alérgicos de ácaros en las tres etapas del proceso de fabricación (MPA, IFA y producto final).

Materiales y Métodos

Descripción de las muestras

Se realizó un único estudio de validación utilizando como muestras extractos de los ácaros Bt y Ds en las tres etapas del proceso de fabricación (MPA, IFA y producto final). Teniendo en cuenta principio de agrupación de alérgenos homólogos establecido por la Monografía sobre Productos Alérgicos de la Farmacopea Europea (2010:1063), los resultados del extracto de Ds son aplicables al ácaro Dp. A continuación, se muestran los lotes empleados:

-MPA del extracto alérgico de Bt, lote 1102

- MPA del alergénico de *Ds*, lote 0902
- IFA del extracto alergénico de *Bt*, lote AB12IFA004
- IFA del extracto alergénico de *Ds*, lote AS12IFA001
- Producto final del extracto alergénico de *Bt*(Referencia Interna), lote 601001
- Producto final del extracto alergénico de *Ds* (Referencia Interna), lote 50101

Preparación de las muestras

Las muestras de MPA e IFA fueron concentradas por precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Se mezcló cada muestra con TCA al 20 % a partes iguales. Se dejó reposar la mezcla durante 1 h a 4°C y luego se centrifugó a 12 000 rpm, durante 15 min. El sobrenadante fue desechado y el pellet se lavó 3 veces con acetona fría, se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min y se dejó secar bien a temperatura ambiente. El pellet final se disolvió en agua (dilución 1:10). Las muestras de producto final (extractos liofilizados) se reconstituyeron con agua destilada hasta lograr una concentración equivalente a 20 000 UB de *Ds* y 100 000 UB de *Bt*. Finalmente se adicionó solución de buffer no reductor para el caso de las muestras de *Ds* y buffer reductor para las de *Bt* y se calentaron las muestras el Bloque Térmico por 5 minutos.

Método analítico SDS-PAGE

El sistema consta de una cámara de electroforesis acoplada a una fuente de corriente alterna. La técnica se realizó según PNO 06.054 “Electroforesis de Extractos Alergénicos en gel de poliacrilamida-SDS (Sistema Discontinuo)”. Las condiciones de corrida del gel fueron: 25 mA de corriente y voltaje abierto. Se aplicaron 10µL de cada muestra. Una vez terminada la corrida del gel, se realizó la tinción durante 1 hora en la zaranda a temperatura ambiente y luego la destinción 2 ó 3 veces hasta lograr una completa visualización de las bandas. Se realizó el análisis densito métrico mediante el sistema Image Master v4.0 (Amersham Pharmacia) y se determinó el peso molecular de las bandas detectadas y el porcentaje del área bajo la curva de las bandas principales:

- 15 a 17 kDa y 25 a 26 kDa para *Ds* (corresponden a los alérgenos mayores Der s 2 y Der s 1 respectivamente) para las tres variantes MPA, IFA y Producto Final.
- 12 a 21 kDa para *Bt* (corresponden a los componentes alergénicos principales de dicho ácaro) para las tres variantes MPA, IFA y Producto Final, además se incluye la banda de 28 a 32 kDa para la MPA.

Método de validación

El método de validación fue diseñado de acuerdo con lo expresado en la GUIA No. 41-2013 “Validación de Métodos Analíticos” del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Está compuesto por los ensayos de precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad), exactitud, especificidad y límite de detección. Las muestras empleadas y su preparación se describen en los acápites 2.1 y 2.2. Los ensayos se realizaron en tres laboratorios de BIOCEN: Laboratorio de Alérgenos, Laboratorio de Control del Proceso de la Planta de Ingredientes Activos (PIA) y Laboratorio de Control de la Calidad. La técnica de SDS-PAGE se realizó para cada producto como se describe en el acápite 2.3.

La precisión del método se determinó a través de los ensayos de repetibilidad (intraensayo), precisión intermedia (interensayo) y reproducibilidad (interlaboratorio).

La **repetibilidad** se evaluó por un analista del Laboratorio de Alérgenos. Se realizó la técnica aplicando 6 réplicas de cada muestra. Se determinaron mediante una hoja cálculo en Excel la media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV%) de los valores de los PM y de la suma del por ciento del área bajo la curva de cada banda ($\Sigma A\%$). Se repitió 3 veces el análisis densitométrico de los geles de producto terminado, empleando los mismos parámetros del software. Se tuvieron como criterios de aceptación que los CV% de los valores de $\Sigma A\%$ entre réplicas y entre diferentes análisis densitométricos fuera < 5%.

La **precisión intermedia** se llevó a cabo por dos analistas en el Laboratorio de Alérgenos durante 3 días diferentes para cada muestra analizada. Se realizó la técnica para cada muestra por triplicado. Se calcularon la media, la DE y el CV% para cada analista por separado y el total. Los criterios de aceptación adoptados fueron: que los CV% para los valores de $\Sigma A\%$ de las bandas principales entre los diferentes días por un mismo analista y el CV% total fueran < 5% y que no existieran diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de CV% de diferentes analistas según la prueba de Fisher.

La **reproducibilidad** de la técnica se determinó por dos analistas en diferentes laboratorios (el primer analista del Laboratorio de Alérgenos y el segundo analista de Control del Proceso de PIA en el caso de las muestras de MPA e IFA, en el caso del producto terminado el segundo analista fue de Control de la Calidad). Se realizó el ensayo para cada muestra a dos concentraciones diferentes (40 000 UB-20 000 UB para *Ds* y 200 000 UB-100 000 UB para *Bt*). Calcule los valores de la media, la DE y el CV% para cada analista por separado y el total. Los criterios de aceptación fueron que el CV% de $\Sigma A\%$ de las bandas principales entre diferentes días por un mismo analista para cada

concentración y el CV% total fueran < 5% y la no existencia de diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los CV% de diferentes analistas según la prueba de Fisher.

Para evaluar la **exactitud** de la técnica en la determinación de los pesos moleculares de las bandas principales se tomó los resultados del cálculo de los pesos moleculares obtenidos en el ensayo de repetibilidad para cada producto. Se compararon los resultados de los pesos determinados con el valor real reportado en la literatura para los alérgenos principales de ambos extractos (*Bt* y *Ds*). Para ello se utilizó una prueba de *t* de Student y se tuvo como criterio de aceptación la no existencia de diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el valor experimental y el valor real.

El ensayo de **especificidad** consistió en determinar la posible interferencia del bicarbonato de amonio, componente del tampón de las formulaciones. Se realizó un ensayo para cada producto por un solo analista en el Laboratorio de Alérgenos aplicando en cada uno 2 muestras con bicarbonato de amonio adicional a 2 concentraciones diferentes (5-10 mg/mL). Se realizó el cálculo de los pesos moleculares y se compararon con los resultados de los pesos moleculares de las bandas principales obtenidos en el ensayo de repetibilidad para una de las réplicas de cada extracto alérgico. Para ello se utilizó un ANOVA y se tuvo como criterio de aceptación la no existencia de diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los porcentajes de las bandas principales obtenidos entre los extractos alérgicos en su composición original y los que presentan bicarbonato de amonio para cada producto.

La determinación del **límite de detección** (LD) se llevó a cabo por un solo analista del laboratorio de Control de la Calidad en el caso del producto terminado y del Laboratorio de Alérgenos en el caso de la MPA y el IFA. Se aplicaron en geles separados cada una de las muestras con las siguientes concentraciones:

Ds: 40 000, 30 000, 20 000, 15 000, 10 000, 5 000, 2 500, 1 250 UB

Bt: 200 000, 150 000, 100 000, 75 000, 50 000, 25 000, 12 000, 6 500 UB

Se realizó el análisis densitométrico de cada gel y se determinó el límite de detección como la menor concentración en que se detectan todas las bandas principales de cada producto. Se tuvo como criterio de aceptación del ensayo que el LD < 20 000 UB para *Ds* y < 100 000 UB para *Bt*.

Resultados

Desempeño del método analítico

Los resultados de los ensayos de Repetibilidad para las muestras de IFA, MPA y producto terminado, para *Ds* y *Bt* se muestran en las tablas I y II, respectivamente. Como se puede observar los valores del CV% de los valores de $\Sigma A\%$ entre réplicas de cada análisis y entre los diferentes análisis densitométricos son menores que 5%, por lo que quedó demostrada la precisión intraensayo del método.

Tabla 1. Resultados del ensayo de **repetibilidad** para *Ds*. Sumatoria del por ciento del área bajo la curva de las bandas principales ($\Sigma A\%$).

<i>Ds</i>		Producto terminado		MPA		IFA	
		$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$
		15 – 17kDa	25 – 26 kDa	15 -17kDa	25 – 26 kDa	15 – 17 kDa	25 – 26 kDa
Análisis 1	Media	14.222	57.882	44.622	31.475	26.355	50.458
	DE	0.249	0.331	0.199	0.292	0.424	0.145
	CV%	1.751	0.571	0.446	0.926	1.610	0.287
Análisis 2	Media	14.338	57.523	44.727	31.568	26.14	50.608
	DE	0.195	0.370	0.208	0.309	0.288	0.230
	CV%	1.363	0.644	0.465	0.978	1.103	0.454
Análisis 3	Media	13.377	58.360	44.992	31.417	26.712	50.217
	DE	0.282	0.138	0.637	0.428	0.209	0.459
	CV%	2.111	0.236	1.415	1.361	0.783	0.915
e/ Análisis	Media	13.979	57.922	44.780	31.487	26.402	50.428
	CV%	3.754	0.725	0.426	0.243	1.097	0.392

Tabla 2. Resultados del análisis de **repetibilidad** para *Bt*. Sumatoria del porcentaje del área bajo la curva de las bandas principales ($\Sigma A\%$).

<i>Bt</i>	Producto terminado	MPA			IFA
		$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$
		12 – 21 kDa	12 – 21 kDa	28 – 32 kDa	12 – 21 kDa
Análisis 1	Media	45.635	53.950	21.853	59.572
	DE	0.397	1.086	1.025	0.930
	CV%	0.869	2.013	4.692	1.561
Análisis 2	Media	45.837	54.117	21.845	62.104
	DE	0.782	1.333	0.893	2.398
	CV%	1.706	2.464	4.089	3.862
Análisis 3	Media	45.788	53.860	21.663	62.530
	DE	0.617	0.802	0.459	1.540
	CV%	1.348	1.490	2.117	2.463
e/ Análisis	Media	45.753	53.976	21.787	61.402
	CV	0.230	0.241	0.493	2.605

Las tablas III y IV muestran los resultados del ensayo de precisión intermedia para las muestras de *Ds* y *Bt*, respectivamente. La precisión inter ensayo quedó demostrada pues, como se puede observar, los CV% para los valores de $\Sigma A\%$ de las bandas principales entre los diferentes días por un mismo analista y el CV% total fueron < 5% y no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de CV% de diferentes analistas según la prueba de Fisher.

Tabla 3. Resultados del análisis de **precisión intermedia** para *Ds*. Sumatoria del porcentaje del área bajo la curva de las bandas principales ($\Sigma A\%$).

<i>Ds</i>	Producto terminado	MPA				IFA			
		$\Sigma A\%$							
		15 – 17 kDa	25 – 26 kDa	15 – 17 kDa	25 – 26 kDa	15 – 17 kDa	25 – 26 kDa	15 – 17 kDa	25 – 26 kDa
Analista 1	Media	14.368	58.693	45.408	27.956	45.512	25.436		
	CV% entre días	0.519	0.202	1.172	1.491	0.605	0.557		
Analista 2	Media	14.649	58.542	44.930	28.220	45.512	25.546		
	CV% entre días	1.841	0.269	1.321	0.688	0.189	0.740		
	p (Prueba Fisher)	0.142	0.724	0.892	0.356	0.178	0.719		
	CV% total	1.62	0.26	1.26	1.16	0.40	0.63		

Tabla 4. Resultados del análisis de **precisión intermedia** para *Bt*. Sumatoria del porciento del área bajo la curva de las bandas principales ($\Sigma A\%$).

<i>Bt</i>		Producto terminado	MPA	IFA	
		$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$
		12 – 21 kDa	15 – 17 kDa	28-32kDa	12 – 21kDa
Analista 1	Media	45.443	46.150	21.613	37.427
	CV% entre días	1.617	4.504	4.120	4.453
Analista 2	Media	44.741	45.409	21.834	38.507
	CV% entre días	0.521	1.821	3.78	1.300
	p (Prueba Fisher)	0.183	0.273	0.726	0.166
	CV% total	1.42	3.22	4.34	3.29

La reproducibilidad del método se evaluó comparando los resultados de la técnica en laboratorios diferentes (el primer analista del Laboratorio de Alérgenos y el segundo analista de Control de Proceso de PIA en el caso de las muestras de MPA e IFA, en el caso del producto terminado el segundo analista fue de Control de la Calidad). Como se puede apreciar en las tablas V y VI, la precisión interlaboratorio quedó demostrada tanto para las muestras de *Ds* como para *Bt*, pues el CV% de $\Sigma A\%$ de las bandas principales entre diferentes días por un mismo analista para cada concentración y el CV% total fueron $< 5\%$ y no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los CV% de diferentes analistas según la prueba de Fisher.

Tabla 5. Resultados del análisis de **reproducibilidad** para *Ds*. Sumatoria del porciento del área bajo la curva de las bandas principales ($\Sigma A\%$). 40 000 UB (Conc. 1), 20 000 UB (Conc. 2)

<i>Ds</i>		Conc. 1	Conc. 2	Conc. 1	Conc. 2
		$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$	$\Sigma A\%$
		15 – 17 kDa	15 – 17 kDa	25 – 26 kDa	25 – 26 kDa
MPA	Lab. Alergenos	0,613	0,542	1,208	1,080
	CV% e/ días	0,281	0,193	0,725	0,931
	p (Prueba Fisher)	0,41	0,11	0,53	0,76
	CV% total	0,13	0,49	0,37	0,34
IFA	Lab. Alergenos	0,472	0,668	1,040	0,979
	CV% e/ días	0,374	0,601	1,032	1,100
	p (Prueba Fisher)	0,62	0,82	0,99	0,81
	CV% total	0,13	0,29	0,35	0,34
Producto terminado	Lab. Alergenos	0,545	0,348	1,089	1,398
	CV % e/ días	0,731	0,463	1,275	0,858
	p (Prueba Fisher)	0,54	0,55	0,74	0,31
	CV% total	0,04	0,07	0,67	0,65

Tabla 6. Resultados del análisis de **reproducibilidad** para *Bt*. Sumatoria del porcentaje del área bajo la curva de las bandas principales ($\Sigma A\%$). 200 000 UB (Conc. 1) 100 000 UB (Conc. 2).

<i>Bt</i>		Conc. 1	Conc. 2	Conc. 1	Conc. 2
		$\Sigma A\%$ 12 – 21kDa	$\Sigma A\%$ 12 – 21 kDa	$\Sigma A\%$ 28 – 32kDa	$\Sigma A\%$ 28 – 32 kDa
MPA	Lab. Alergenos	0,920	0,857	2,893	1,332
CV% e/ días	Lab. Control calidad	0,432	0,537	1,826	1,599
p (Prueba Fisher)		0.94	0.46	0.63	0.70
CV total		0,39	0,17	1,42	0,16
IFA	Alergenos	0,484	0,651	-	-
CV% e/ días	Control calidad	0,583	0,652	-	-
p (Prueba Fisher)		0.51	0.63	-	-
CV total		0,11	0,32	-	-
Producto terminado	Alergenos	2,054	1,299	-	-
CV % e/ días	Control calidad	0,578	1,220	-	-
p (Prueba Fisher)		0.32	0.34	-	-
CV total		0,36	0,18	-	-

Las tablas VII y VIII muestran los resultados del ensayo de especificidad para las muestras de *Ds* y *Bt* respectivamente. El bicarbonato de amonio, componente del tampón de las formulaciones, no ofreció interferencia en la determinación de la composición de proteínas en los extractos alérgicos, pues no hubo diferencias significativas (AMOVA, $p > 0,05$) entre los porcentajes de las bandas principales obtenidos para los extractos alérgicos en su composición original y los que presentaban bicarbonato de amonio para cada producto.

Tabla 7. Resultados del análisis de **especificidad** para *Ds*. Sumatoria del porcentaje del área bajo la curva de las bandas principales ($\Sigma A\%$).

<i>Ds</i>	Producto terminado		MPA		IFA	
	$\Sigma A\%$ 15 – 17 kDa	$\Sigma A\%$ 25 – 26 kDa	$\Sigma A\%$ 15 – 17 kDa	$\Sigma A\%$ 25 – 26 kDa	$\Sigma A\%$ 15 – 17 kDa	$\Sigma A\%$ 25 - 26 kDa
Sin Bicarbonato	13.98	57.92	44.8	31.5	26.1	50.35
Conc. 1	14.62	58.04	43.27	31.67	26.84	50.07
Conc. 2	14.80	60.00	44.23	32.06	26.84	50.26
Prom	14.47	58.7	43.75	31.865	26.61	50.23
DE	0.43	1.17	0.68	0.28	0.41	0.14
p (ANOVA)	0.2971		0.5668		0.6349	

Tabla 8. Resultados del análisis de **especificidad** para *Bt*. Sumatoria del porcentaje del área bajo la curva de las bandas principales ($\Sigma A\%$).

<i>Bt</i>	Producto terminado		MPA		IFA	
	$\Sigma A\%$ 12 – 21 kDa		$\Sigma A\%$ 12 – 21 kDa	$\Sigma A\%$ 28 – 32kDa	$\Sigma A\%$ 12 – 21 kDa	
Sin Bicarbonato	27.8	17.88	54.0	21.8	26.9	34.38
Conc. 1	26.63	19.29	55.22	22.12	25.47	35.91
Conc. 2	27.13	18.41	54.81	21.87	27.85	33.93
Prom	26.88	18.85	55.015	21.995	26.7	34.7
DE	0.35	0.62	0.29	0.18	1.20	1.04
p (ANOVA)	0.183		0.0861		0.9534	

El método demostró ser exacto pues, como se muestra en las tablas IX y X, tanto para las muestras de *Ds* como para las de *Bt*, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$, t de Student) entre el valor experimental y el valor real del peso molecular de las bandas principales.

Tabla 9. Resultados del análisis de **exactitud** para *Ds*.

<i>Ds</i>	Producto terminado			MPA		IFA	
	15– 17 kDa	25– 26 kDa	26	15– 17 kDa	25-26 kDa	15-17 kDa	25-26 kDa
PM nominal	15.500	26.500		15.5	26.5	16.0	26.5
PM promedio	15.325	26.793		15.164	26.773	15.146	26.287
T	1.099	4.023		1.491	0.010	2.981	2.393
p (Prueba t Student)	0.386	0.057		0.274	0.993	0.097	0.139

Tabla 10. Resultados del análisis de **exactitud** para *Bt*.

<i>Bt</i>	Producto terminado	MPA		IFA
	12 – 21 kDa	12 – 21 kDa	28 – 32 kDa	12 – 21 kDa
PM nominal	18.000	18.00	31.0	18
PM promedio	18.269	17.985	31.233	18.162
T	2.551	0.160	2.427	2.346
p (Prueba t Student)	0.125	0.888	0.136	0.144

Los resultados de la determinación del límite de detección se resumen en la Tabla XI. Luego se muestran los análisis densitométricos de los geles de MPA (Figura. 1 y Figura. 2), IFA (Figura. 3 y Figura. 4) y Producto terminado (Figura. 5 y Figura. 6) para ambas especies (*Ds* y *Bt*). En todos los casos se cumplió con el criterio de aceptación del ensayo $LD < 20\ 000$ UB para *Ds* y $< 100\ 000$ UB para *Bt*.

Tabla 11. Resultados del límite de detección para *Ds* y *Bt*.

Límite de detección	Producto terminado	MPA	IFA
<i>Ds</i>	2 500 UB	5 000 UB	2 500 UB
<i>Bt</i>	12 500 UB	50 000 UB	12 500 UB

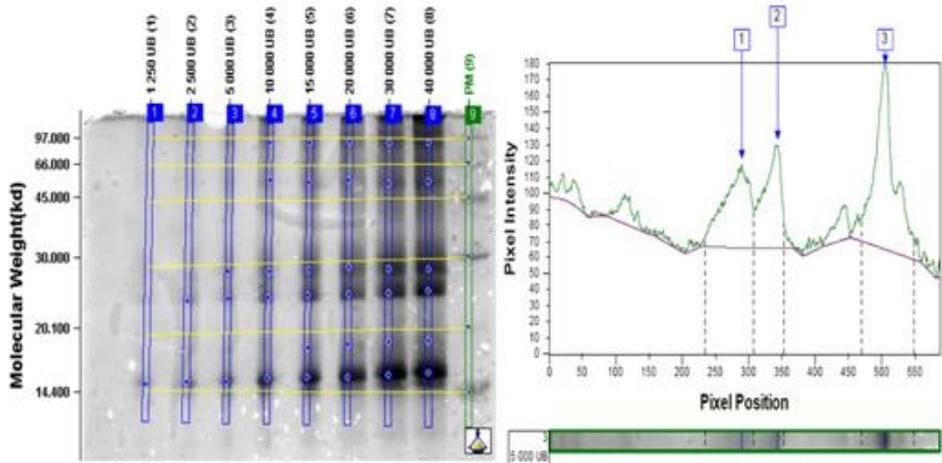


Fig. 1. Análisis densitométrico del gel del Límite de detección para MPA deDs.

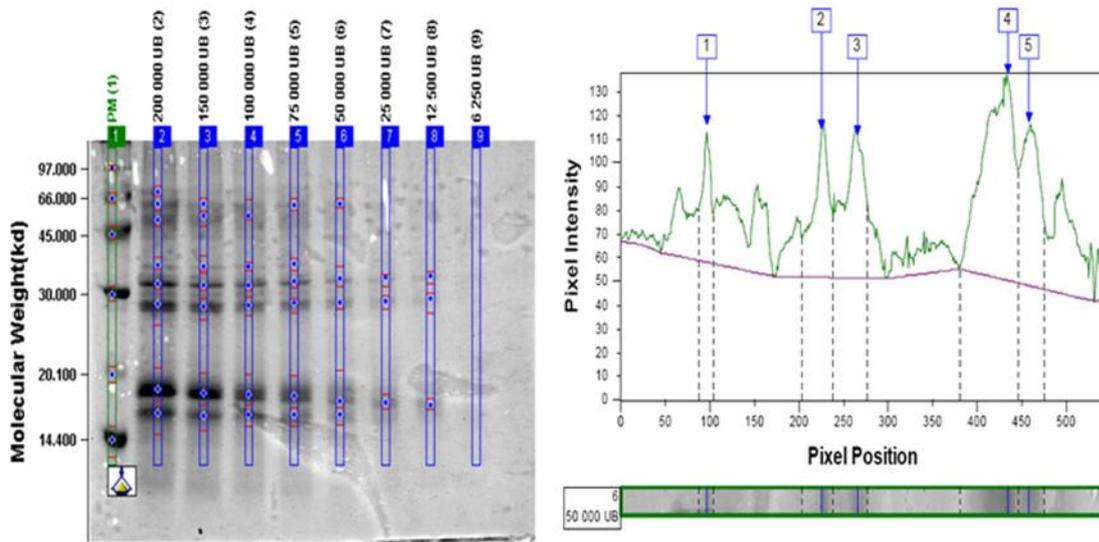


Fig. 2. Análisis densitométrico del gel del Límite de detección para MPA deBt.

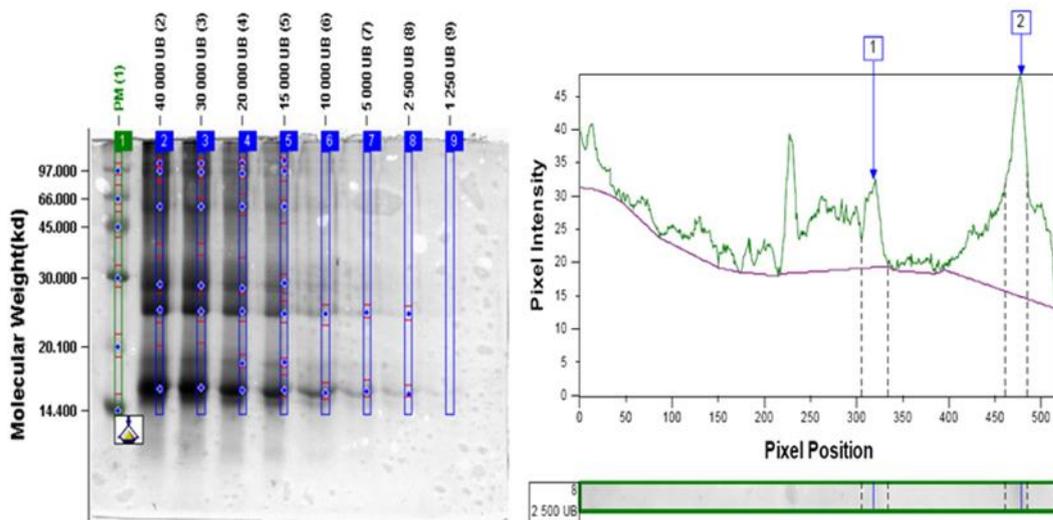


Fig. 3. Análisis densitométrico del gel del Límite de detección para IFA de Ds

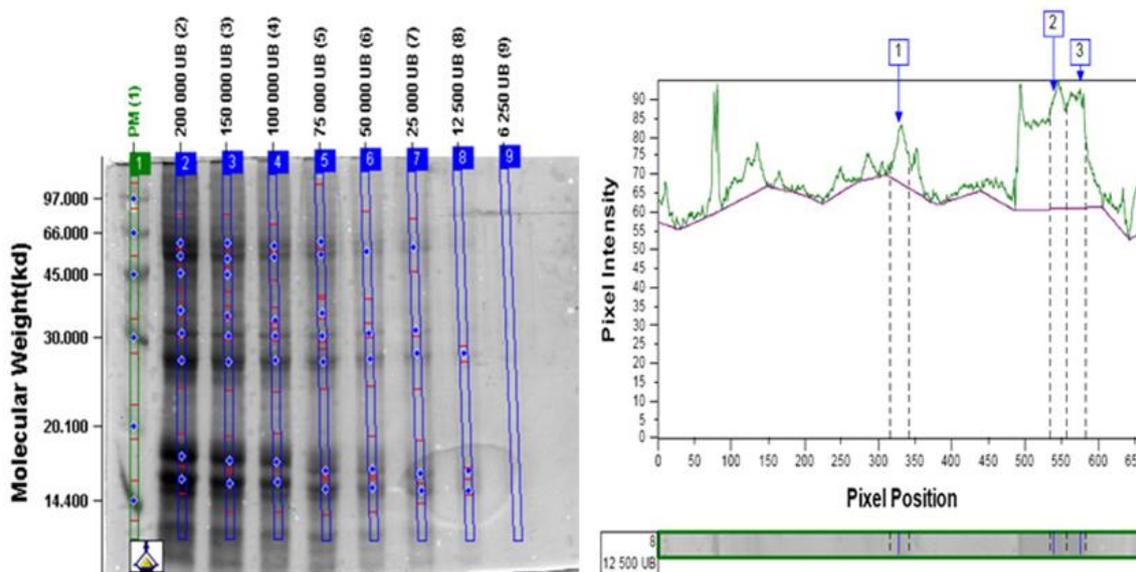


Fig 4. Análisis densitométrico del gel del Límite de detección para IFA de Bt.

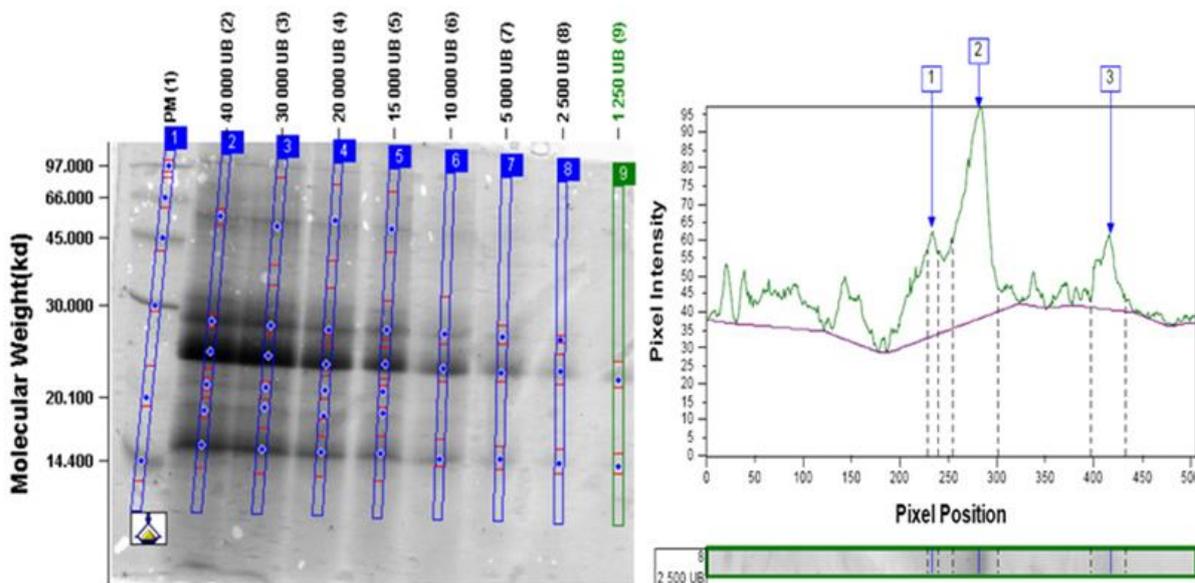


Fig. 5. Análisis densitométrico del gel del Límite de detección para producto terminado de Ds.

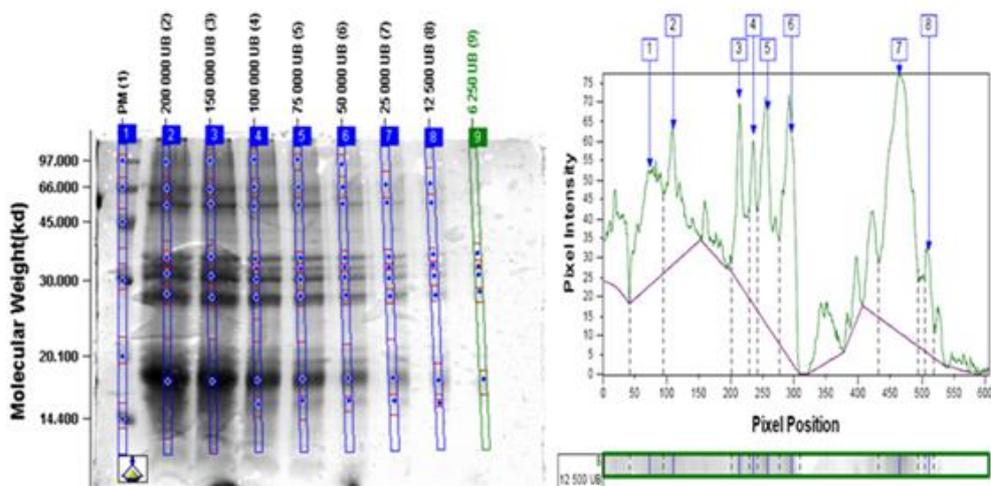


Fig. 6. Análisis densitométrico del gel del Límite de detección para producto terminado de Bt.

DISCUSIÓN

BIOCEN desarrolló tres extractos alergénicos estandarizados de ácaros del polvo doméstico: VALERGEN-DP, VALERGEN-DS y VALERGEN-BT para el tratamiento del asma alérgica (Labrada, 2008). En 2006 se logró el Registro Sanitario en Cuba como vacunas terapéuticas (inyectables) y posteriormente en el año 2009 fue registrada la vía sublingual. Los productos VALERGEN están actualmente indicados para el tratamiento del asma alérgica, de leve a moderada, asociada a estos ácaros. Contar con estas vacunas estandarizadas constituye una herramienta de gran valor para elevar la calidad de la atención al paciente alérgico y asmático, su calidad de vida y la progresión de la enfermedad alérgica considerando que la IT es el único tratamiento capaz de modificar el curso de esta enfermedad (Castro et al., 2020).

La producción de estas vacunas parte del cultivo de los ácaros del polvo doméstico en condiciones de laboratorio. El resultado de la propagación de los mismos se define como la Materia Prima Alergénica (MPA). Hasta el momento, la MPA se concibe como el primer producto intermedio en el proceso productivo con especificaciones de calidad definidas y métodos de ensayos. Entre los parámetros establecidos por la Monografía sobre productos Alergénicos de la Farmacopea Europea (2010:1063), están de forma obligatoria la Identidad y la Pureza, entendida esta última como la ausencia de contaminantes vivos como otras especies de ácaros e insectos u otras sustancias alergénicas o ajenas al cultivo. El Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) de los extractos alergénicos de ácaros, es el segundo producto intermedio en el proceso de fabricación de este tipo de producto y lo constituyen los extractos alergénicos a granel obtenidos. La guía europea sobre calidad de los productos alergénicos de la EMA (CPMP/BWP/243/96) estipula la aplicación de ensayo de composición de proteínas o alérgenos, usuales para los productos finales, también a la Materia Primas Alergénica y el Ingrediente Farmacéutico Activo de manera que se pueda asegurar la calidad del producto final ya desde sus estadios iniciales.

La técnica de SDS-PAGE es un método rápido, reproducible y de bajo costo a nivel de muestra. Es ampliamente utilizada para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas (Wiesner et al., 2021). Se venía empleando en el laboratorio de Alérgenos para determinar la composición de proteínas en el producto terminado de las vacunas VALERGEN y se hacía necesario extender su uso para los productos intermedios (MPA e IFA). Por tanto, este estudio presenta la validación del método de SDS-PAGE para los extractos alergénicos de ácaros (productos intermedios y final). Durante el desarrollo de un producto, la validación de los métodos analíticos utilizados en las actividades de control desempeña un papel determinante, pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de dicho producto en cada fase del proceso productivo. (GUÍA No. 41-2013, CECMED).

Las bandas alergénicas más importantes de los extractos de ácaros del género *Dermatophagoides* se localizan en las regiones de 15-17, 25-26 y 30 kDa. Los extractos de Dp y Ds producidos en BIOCEN tiene como componentes alergénicos mayoritarios a Der s1 y Der p1, localizados en la región de 25-26 kDa y a Der s2 y Der p2, localizados en la región de 15-17 KDa (Labrada, 2008).

De los alérgenos de Bt, Blo t 5 presenta una unión a IgE de 40-60% ha sido registrado como alérgeno principal junto con Blo t 21 (pesos moleculares de 14 y 13 kDa respectivamente). Blo t 2 es una proteína polimórfica, que presenta tres iso formas de peso molecular entre 13,5-15 kDa (Santos da Silva et al., 2017). Diferentes autores colocan a Blo t 2 como un componente responsable en gran medida de la actividad alergénica del extracto, con un alto

reconocimiento por anticuerpos específicos en suero de pacientes cubanos, según se determinó mediante Western blotting (Mateo et al., 2015).

El estudio de precisión de la técnica de SDS-PAGE para extractos de ácaros mostró una buena repetibilidad y reproducibilidad de los resultados, obteniéndose CV menores que 5%. Estos resultados cumplen no solo con los criterios de aceptación de la guía nacional del CECMED (GUIA No. 41-2013), sino también con lo expresado en la guía internacional para la Validación de Métodos Analíticos ICH Q2 (R1). Es importante que los resultados se encuentren en el rango de tolerancia establecido para los productos. Específicamente para la composición de proteínas de los productos alergénicos no se establecen rangos explícitos en los documentos regulatorios internacionales, quedando este aspecto a decisión de los fabricantes. No obstante, en la Monografía para Productos Alergénicos de la Farmacopea Europea (2010:1063), se establecen como rango para el ensayo de contenido de proteínas totales 80-120% y para el de componentes alergénicos individuales 50-150%. La precisión del SDS-PAGE en este trabajo (5%) resultan mucho menor que ambos intervalos, lo cual sostiene la idoneidad de este ensayo para el control de calidad.

Por otro lado, las bandas principales tanto para los extractos de Ds (15 a 17 kDa y 25 a 26 kDa) como de Bt (12 a 21 kDa) fueron identificadas mediante SDS-PAGE con gran exactitud, sin diferencias significativas (t Student, $p > 0.5$) entre los valores de pesos moleculares determinados experimentalmente y los valores registrados en la literatura.

La elaboración y desarrollo del protocolo de validación se realizó teniendo en cuenta lo expresado en la GUIA No. 41-2013 "Validación de Métodos Analíticos" del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Los resultados obtenidos en la validación cumplieron con los criterios de aceptación establecidos en la literatura. Los mismos se considerarán válidos siempre y cuando la técnica se realice como está establecido, necesitándose una revalidación si existieran cambios reales o posibles en su ejecución, realizándose una validación parcial si son cambios menores en el método o una revalidación exhaustiva (revalidación de todos los parámetros aplicables) cuando sean cambios mayores o resultados fuera de especificación imputables al método analítico.

CONCLUSIONES

Quedó validada la técnica analítica SDS-PAGE para la determinación de la composición de proteínas en los extractos alergénicos de ácaros en tres etapas diferentes del proceso de fabricación. Este método se valida por primera vez en BIOECEN para su aplicación como control de la calidad de la Materia Prima Alergénica y para el Ingrediente Farmacéutico Activo (productos intermedios), posibilitando la introducción de esta técnica en el control de dichas etapas. En su conjunto se fortalece el aseguramiento de la calidad de estos productos, con impacto potencial en la seguridad y efectividad de la inmunoterapia alérgica específica.

FONDOS

Este estudio fue respaldado por el Centro Nacional de Biopreparados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias-Cruz A, González-Díaz SN, Macías-Weinmann A, Ibarra-Chávez JA, Sánchez-Guerra D, Leal-Villarreal L, Salinas-Díaz MR. (2018). Calidad de vida en urticaria crónica y su relación con el impacto económico y control de la enfermedad en pacientes atendidos en el Hospital Universitario de Monterrey, México. *Rev Alerg Mex*; 65(3):250-258. DOI:<http://dx.doi.org/10.29262/ram.v65i3.398>
- Asamoah F, Kakourou A, Dhami S, Lau S, Agache I, Muraro A, Roberts G, Akdis C, Bonini M, Cavkaytar O, Flood B, Izuhara K, Jutel M, Kalayci O, Pfaar O y Sheikh A. (2017). Allergen immunotherapy for allergic asthma: a systematic overview of systematic reviews. *ClinTransl*; 7:25.
- Caraballo L, Zakzuk J, Lee BW, et al. Particularities of allergy in the tropics (2016). *World Allergy Organization Journal*; 9:20.
- Cardona R, Sánchez A, Larenas-Linnemann D, Járes E, Sánchez J. (2018). Extractos alergénicos para inmunoterapia en Latinoamérica. *RevAlergMex*. 65(1):25-40.
- Castro RL, Ronquillo M, Álvarez M, Rodríguez J, González M, Enríquez I, Navarro BI, Mateo M, Oliva Y, Ramírez W, Cox L, Labrada A. (2020). Subcutaneous allergen immunotherapy for asthma: A randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized *Blomia tropicalis* vaccine. *World Allergy Organization Journal* 13:100098 <http://doi.org/10.1016/j.waojou.100098>
- Cardona R, Sánchez A, Larenas-Linnemann D, Járes E, Sánchez J. (2018). Extractos alergénicos para inmunoterapia en Latinoamérica. *RevAlergMex*. 65(1):25-40.
- Escobar MJ y Guaman BD. (2018). Alergias respiratorias y su relación con la contaminación ambiental. Trabajo de Titulación de Grado Previo a la Obtención del Título de Licenciado en Terapia Respiratoria. Universidad Estatal de Milagro. Ecuador.

- González R. (2018). Revisión: Durmiendo con el enemigo: ácaros y alergia. *Ars Clinica Academica*. Vol.4 Núm.3, pp10-15.
- GUIA No. 41-2013 “Validación de Métodos Analíticos” del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED).
- ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidence for Industry, EMEA September 2021.
- Mateo Morejón M, Perez Llano Y, Capote Tabares M, Garcia Lerena JA, Cruz Jimenez R, Luzardo Lorenzo M and Labrada Rosado A (2015). Allergenic activity of the native Blo t 2 purified from *Blomia tropicalis* culture. *Front. Immunol. Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA - 11th Congress of the Latin American Association of Immunology - 10o. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología*. doi: 10.3389/conf.fimmu.2015.05.00263
- Kang SY, Song WJ, Cho SH, Chang YS. (2018). Time trends of the prevalence of allergic diseases in Korea: A systematic literature review. *Asia PacAllergy*; 8(1).
- Labrada A. (2008). Desarrollo a ciclo completo de las primeras vacunas estandarizadas de alergenos de ácaros para la inmunoterapia del asma en Cuba. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud. Instituto Superior de Ciencias Médicas, La Habana.
- Larsen JN y Dreborg S. (2020). Standardization of Allergen Extracts. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 01 Jan 2019, 2020:63-76 DOI: 10.1007/978-1-4939-9591-2_5 PMID: 31177492.
- Santos da Silva E, Asam C, Lackner P, Hofer H, Wallner M, Silva Pinheiro C, Alcántara-Neves NM and Ferreira F. (2017). Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules. *Int Arch Allergy Immunol*; 172:203.
- Registration of allergen preparations. *Nordic Guidelines*. 2nd edition. Nordic Council on Medicines. Uppsala, Sweden, 1989.
- Wiesner, R., Scheller, C., Krebs, F., Wätzig, H., &Oltmann-Norden, I. (2021). A comparative study of CE-SDS, SDS-PAGE, and Simple Western: Influences of sample preparation on molecular weight determination of proteins. *Electrophoresis*, 42(3), 206-218.

Este artículo no presenta conflicto de intereses.

CONTRIBUCCION AUTORAL

Wendy Ramírez (Conceptualización, Análisis formal, Investigación, Metodología, Recursos, Supervisión, Visualización, Validación, Redacción del borrador original, Revisión y edición de escritura).

Mayteé Mateo (Data curación, Análisis formal, Investigación, Metodología).

Raysa Cruz (Análisis formal, Investigación).

Eilen Beatriz Macías (Análisis formal, Investigación).

Anette García (Data curación, Análisis formal, Redacción del borrador original).

Damaris Torralba (Investigación).

Alexis Labrada (Conceptualización, Análisis formal, Adquisición de fondos, Administración de proyectos, Recursos, Supervisión, Redacción del borrador original, Revisión y edición de escritura).