

Preparación y caracterización de un Material de Referencia de Trabajo de Acetil Colina para determinar Grupos O-acetilo en polisacáridos vacunales

Nuris Iglesias¹, Ileana Martínez¹, Jennifer Abreu¹, Esther María Fajardo¹, Gustavo de Cárdenas², Domingo González¹

¹Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba. E-MAIL: niglesias@finlay.edu.cu

²Centro de Inmunoensayo. Ciudad de La Habana, Cuba

El control de la calidad de los polisacáridos vacunales exige la evaluación del contenido de grupos O-acetilo, que conjuntamente con otros índices, proporciona criterios de la integridad molecular importantes para su inmunogenicidad, como en el caso del polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. El método comúnmente empleado es colorimétrico y requiere de un material de referencia de cloruro de acetil colina para preparar la curva de calibración contra la que se comparan las muestras en estudio. Generalmente, se adquiere el reactivo comercial (sólido) y de éste se prepara la solución de referencia. Esto genera imprecisiones por errores de pesada, características higroscópicas del reactivo, temperatura y tiempo de conservación, entre otras, que influyen en la estimación del contenido de O-acetilo de las muestras. En este trabajo se describe la preparación y caracterización de un Material de Referencia de Trabajo (MRT) de Acetil Colina, liofilizado, para ser empleado en los laboratorios del Instituto Finlay involucrados en el control de la calidad de los polisacáridos purificados de *Neisseria meningitidis* serogrupo C y *Salmonella typhi*. Para su caracterización se empleó como referencia el producto de SIGMA. Los parámetros evaluados fueron: linealidad ($r^2 \geq 0,99$), precisión intermedia (CV=2,63%), reproducibilidad (CV=2,73%), exactitud (recuperación: 96%) y estabilidad (10 meses hasta el momento actual). Los resultados obtenidos en la evaluación de este MRT demostraron que es adecuado para el ensayo. Esto ha sido corroborado durante más de 10 meses de uso en la rutina del laboratorio.

Palabras Claves: Acetil colina, O-acetilo, polisacárido, *Salmonella typhi*, *Neisseria meningitidis*, material de referencia.

Introducción

El control de la calidad de los polisacáridos vacunales exige la evaluación del contenido de grupos O-acetilo (1, 2), que conjuntamente con otros índices, proporciona criterios de la integridad molecular, como en el caso del polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. Este parámetro es importante puesto que son esos grupos los responsables de la inmunogenicidad (3).

El método colorimétrico empleado (Hestrin, 1949) (4), requiere de un material de referencia de cloruro de acetil colina para la preparación de la curva de calibración contra la que se comparan las muestras en estudio. Generalmente, se adquiere el reactivo comercial (sólido) y a partir de éste se prepara la solución de referencia. Esto provoca imprecisiones en la técnica debidas a errores de pesada, a las características higroscópicas del reactivo y a la temperatura y tiempo de conservación, entre otras, lo

cual influye en la estimación del contenido de O-acetilo de las muestras.

Por todas estas razones, se hizo necesario preparar y caracterizar un material de referencia de trabajo que estuviera a la disposición de todos los laboratorios de la Institución y que garantizara la confiabilidad en las determinaciones realizadas. El presente trabajo describe la preparación y caracterización del primer lote de material de referencia de trabajo de esta sustancia, para ser empleado en el control de la calidad de los polisacáridos vacunales C (de *Neisseria meningitidis* serogrupo C) y Vi (de *Salmonella typhi*).

Materiales y Métodos

MATERIALES

Para la preparación del lote de material de referencia se utilizó acetil colina de Fluka (Suiza), lote 46874/1

42597 código 01018.0001, con masa molecular de 181.67 g/mol.

La preparación del material se realizó bajo flujo laminar y se utilizaron pipetas automáticas certificadas de 1000 y 200 μL respectivamente (Gilson) para su distribución.

Las lecturas de Absorbancia (Abs) se realizaron en un espectrofotómetro Ultrospec III (Farmacia-LKB, Suecia).

Métodos

Preparación del lote

La preparación del lote de Material de Referencia de Trabajo de Acetil Colina para la determinación de grupos O-acetilo, se realizó teniendo en cuenta lo establecido en el Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) correspondiente¹.

Se disolvieron 3 g de acetil colina en agua destilada, llevando el volumen hasta 200 mL. Se homogeneizó la solución durante 30 min con agitación mecánica, a 18 °C. El material se distribuyó en condiciones asépticas en bulbos de 10 mL, en alícuotas de 1,2 mL y se conservó a -20 °C hasta su posterior liofilización.

Determinación de la imprecisión del llenado

Se controló gravimétricamente. Para ello, se procedió a la tara de un número de frascos (aproximadamente el 10% del total esperado para el lote) en una balanza analítica (Sartorius, Alemania). Estos bulbos se llenaron a lo largo del proceso, alternando con el resto de los frascos del lote. Al final, se pesaron de nuevo y se calculó el contenido del producto por la diferencia entre peso final y el peso inicial. Se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de estos valores.

Liofilización

El proceso de liofilización se realizó con una temperatura inicial de -40 °C y una temperatura final de 30 °C, en un tiempo total de 20,5 h (congelación: 3 h; secado primario: 4 h; secado secundario: 13,5 h).

Caracterización

Se determinó la concentración de acetil colina, empleando el método de Hestrin (4). Como sustancia

¹ PNO 15-002 (2001) "Preparación, caracterización e identificación de materiales de referencia", Instituto Finlay.

de referencia se usó el producto de SIGMA (USA, Lote 037H6184). Se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad y estabilidad. Cada bulbo del material liofilizado se reconstituyó con un volumen de 1 mL de agua destilada y se evaluó el contenido de grupos O-acetilo, con la posterior corrección de su concentración.

- **Linealidad.**

Se evaluaron las curvas de calibración realizadas en 7 días diferentes.

- **Exactitud**

Las muestras liofilizadas se diluyeron con agua destilada para concentraciones de 0,83; 1,66; 2,48; 3,32 y 4,15 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente y se evaluaron en paralelo con el material de referencia de SIGMA, ajustado a 15 mg/mL y diluido de igual manera.

- **Precisión intermedia**

Se evaluó sobre la base de las pendientes de las curvas preparadas a partir de diferentes frascos del producto liofilizado, con valores de concentración para cada uno de sus puntos de 0,797; 1,594; 2,393; 3,188 y 3,988 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente y se evaluaron durante 7 días.

- **Reproducibilidad**

Se evaluó sobre la base de las pendientes de las curvas preparadas a partir de diferentes frascos del producto liofilizado, con valores de concentración para cada uno de sus puntos de 0,0265; 0,053; 0,133; 0,266 y 0,399 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente, y se evaluaron en condiciones diferentes (días, analistas y laboratorios).

- **Estabilidad**

Se evaluó sobre la base de la comparación de las pendientes de las curvas preparadas con el lote en estudio, obtenidas a tiempo cero y después de 10 meses.

Análisis Estadístico

Se realizó mediante el programa computadorizado Microsoft Excel. Se compararon las medias y las varianzas de los resultados obtenidos para ambos materiales de referencia para detectar si existía diferencias entre ellos. Se utilizaron las pruebas de hipótesis F de Fisher y t de Student.

Resultados y Discusión

Los resultados de los diferentes parámetros evaluados durante la caracterización del material de referencia de trabajo de acetil colina se señalan a continuación:

- **Precisión del llenado**

La determinación del coeficiente de variación de los valores obtenidos en el pesado del material de referencia antes de liofilizar fue de 0,64%.

- **Linealidad**

Se ensayaron curvas de calibración realizadas en 7 días diferentes. La linealidad obtenida fue adecuada, con coeficientes de determinación y correlación mayores que 0,99 e intercepto con diferencias no significativas con respecto al eje de coordenadas. En la Tabla 1 se muestran los valores obtenidos en los diferentes ensayos.

Intervalos de confianza de la curva: Pendiente: $0,1530 \pm 0,0030$.

Intercepto: $-0,00016 \pm 0,00543$

Tabla 1. Resultados de las curvas obtenidas en el ensayo de linealidad.

| Días | Pendientes | Interceptos |
|---------------|--------------|----------------|
| 1 | 0,147 | 0,016 |
| 2 | 0,158 | -0,005 |
| 3 | 0,158 | -0,005 |
| 4 | 0,150 | -0,006 |
| 5 | 0,153 | -0,004 |
| 6 | 0,153 | -0,001 |
| 7 | 0,152 | 0,003 |
| Media | 0,153 | -0,0002 |
| CV (%) | 2,63 | |

- **Exactitud**

Los valores de concentración ($\mu\text{mol/frasco}$) obtenidos para el MRT en estudio presentaron un valor promedio de $7,98 \mu\text{mol/frasco}$, lo cual equivale a $14,49 \text{ mg/frasco}$, con un coeficiente de variación de 2,63% y una recuperación del 96% (Tabla 2).

Hubo diferencias significativas entre el valor de concentración del estándar de SIGMA y el valor

obtenido para el lote estudiado (nivel de confianza 95%), ya que el valor asociado a la t calculada fue mayor que el valor de t tabulado. El lote se preparó para que tuviera un contenido de 15 mg/frasco . El valor corregido para este material de referencia liofilizado fue $14,49 \text{ mg/frasco}$.

Tabla 2. Contenido de acetil colina en el producto liofilizado, obtenido del ensayo de exactitud, utilizando como material de referencia el reactivo de Sigma.

| Sigma ($\mu\text{mol/mL}$) | MRT ($\mu\text{mol/frasco}$) |
|---|--------------------------------|
| | 7,97 |
| | 8,37 |
| | 7,66 |
| | 7,99 |
| 0,83; 1,66; 2,48; 3,32; 4,45 | 7,94 |
| | 7,96 |
| | 7,98 |
| | 7,96 |
| | 7,89 |
| | 8,00 |
| Promedio ($\mu\text{mol/frasco}$) | 7,98 |
| (mg/frasco) | 14,49 |

- **Precisión intermedia**

El método mostró una precisión adecuada, ya que el CV fue de 2,63%; para los métodos colorimétricos se acepta por lo general hasta 3% (5). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de las pendientes obtenidas en el ensayo de precisión intermedia del nuevo MRT en diferentes días.

| Fecha | MRT ($\mu\text{mol/mL}$) | Pendientes |
|----------|----------------------------|--------------|
| 08/12/00 | | 0,147 |
| 14/12/00 | | 0,158 |
| 15/12/00 | | 0,158 |
| 26/12/00 | 0,797; 1,594; 2,393; | 0,150 |
| 05/02/01 | 3,188; 3,988 | 0,153 |
| 12/03/01 | | 0,153 |
| 21/03/01 | | 0,152 |
| | Media | 0,152 |
| | CV (%) | 2,63 |

Además, se evaluó la precisión para tres niveles de concentración diferentes dentro de la curva de calibración (bajo, medio y alto). Se observó que a medida que se incrementaba la concentración de acetil colina, el resultado obtenido era más preciso, pues el

CV era menor (Tabla 4). Esto es muy importante, ya que las muestras de vacuna que se evalúan en el ensayo de rutina donde se emplea este MRT tienen concentraciones entre los niveles medio y alto de la curva.

Tabla 4. Resultados de la evaluación de la precisión a tres niveles de concentración de la curva de calibración preparada con el MRT en estudio.

| Nivel de Concentración | Concentración ($\mu\text{mol/mL}$) | CV (%) |
|------------------------|--------------------------------------|--------|
| Bajo | 0,797 | 4,9 |
| Medio | 2,393 | 2,9 |
| Alto | 3,988 | 0,6 |

• **Reproducibilidad**

Los valores de concentración empleados fueron diferentes porque se corresponden con la curva que se emplea para la evaluación de los lotes de la vacuna final (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de las curvas obtenidas en el ensayo de reproducibilidad en diferentes condiciones (días, analistas y laboratorio).

| Valores de las pendientes | |
|--|------------|
| Analista 1 | Analista 2 |
| 0,443 | 0,482 |
| 0,463 | -- |
| 0,472 | 0,468 |
| 0,474 | 0,477 |
| $t_{\text{calc.}} = 1,94 / t_{\text{tab.}} = 2,44$ | |

El método presentó una reproducibilidad adecuada, con un CV de 2,73% para el total de los valores obtenidos por los dos analistas y no hubo diferencias significativas entre analistas de diferentes laboratorios ya que la t calculada fue menor que la tabulada (nivel de confianza de 95%).

• **Estabilidad**

Los resultados de las pendientes de las curvas evaluadas a tiempo cero y después de 10 meses fueron equivalentes. Como en la actualidad este MRT se usa en la rutina del laboratorio para estimar la concentración de grupos O-acetilo en las muestras, se ha observado que el valor de la pendiente se ha mantenido más allá de los 10 meses estudiados. Esta observación es válida lo mismo para la curva empleada para controlar el ingrediente farmacéutico activo (curva

con puntos de mayor concentración) como para la vacuna final (curva con puntos de menor concentración) (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de la estabilidad del MRT en estudio a tiempo 0 y 10 meses, en términos del valor de la pendiente de la curva de calibración.

| Valores de las pendientes | |
|---------------------------|--------------|
| t = 0 | t = 10 meses |
| 0,486* | 0,463* |
| 0,153** | 0,153** |

* Valor de la pendiente de la curva para vacuna final

** Valor de la pendiente de la curva para el Ingrediente Farmacéutico Activo

En la Tabla 7 se muestra el intervalo de confianza, en el que se encuentran los valores de las pendientes obtenidas, después de transcurridos los 10 meses y hasta un año de trabajo, tanto para el ingrediente farmacéutico activo como en vacuna final, corroborando la estabilidad del MRT en este tiempo.

Tabla 7 Intervalo de confianza de los valores de las pendientes de las curvas para ingrediente farmacéutico activo y vacuna final hasta un año.

| Curva para: | N | Intervalo de Confianza | CV (%) |
|---------------------------------|----|------------------------|--------|
| Ingrediente Farmacéutico Activo | 13 | $0,155 \pm 0,0023$ | 2,67 |
| Vacuna Final | 16 | $0,471 \pm 0,0065$ | 2,77 |

Conclusiones

1. Se preparó el Material de Referencia de Trabajo (MRT) de Acetil Colina para la cuantificación del contenido de grupos O-acetilo en polisacáridos vacunales y se caracterizó sobre la base de los parámetros de linealidad, precisión intermedia, exactitud, reproducibilidad y estabilidad.
2. Este MRT se incorporó a la rutina de trabajo desde hace un año y se ha comportado de manera satisfactoria, por lo que quedó establecido oficialmente para ser empleado por todos los laboratorios del Instituto Finlay.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Serie de Informes Técnicos: Requisitos para vacunas de polisacáridos meningocócicos, 658; 1981.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Serie de Informes Técnicos: Requisitos para la vacuna de polisacárido Vi, 840; 1994.
3. Szu SC, Li X, Stone AL, Robbins JB. Relation between structural and immunologic properties of the Vi capsular polysaccharide. *Infect Immun*. 1991; 59(12):4555-4561.
4. Hestrin S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytic applications. *Journal of Biol Chem*. 1949; 180:249-261.
5. World Health Organization. WHO working group on assessment of clinical technologies. Methods recommended for essential clinical and haematological tests for intermediate hospitals laboratories. Geneva, WHO, Lab/86.3; 1986.

Preparation and Characterization of an Acetyl-Choline Working Reference Material for the Determination of O-Acetyl groups in Vaccine Polysaccharides

Abstract

The quality control of polysaccharides, used as vaccine antigens, requires the quantification of the O-acetyl group content. Together with other parameters, that determination provides criteria about the molecular integrity, which is very important for the immunogenicity, as in the case of *Salmonella typhi* Vi polysaccharide. The colorimetric method is the one most commonly performed. It requires an acetyl-choline chloride standard, for determining the standard curve used for the evaluation of test samples. The present paper describes the preparation and characterization of a lyophilized Acetyl-Choline Working Reference Standard (WRS), for use at the Finlay Institute laboratories involved in the quality control of purified polysaccharides from serogroup C *Neisseria meningitidis* and *Salmonella typhi*. The equivalent product from SIGMA was used as a reference for the characterization. The evaluated parameters were: linearity ($r^2 \geq 0.99$), in-lab precision (CV = 2.63%), reproducibility (CV = 2.73%), accuracy (96% recovery) and stability (from 10 months to the present). The results obtained during the characterization process of the WRS demonstrated that it is appropriate for use as a standard in the assay. That has been confirmed during more than 10-months use in the routine tests carried out in the laboratory.

Keywords: Acetyl-choline, O-acetyl group, polysaccharide, *Salmonella typhi*, *Neisseria meningitidis*, working reference standard