

## Validación de nuevos sistemas para el estudio de marcadores virales en productos hemoderivados cubanos

Romero-Martínez K, Pérez-Guevara MT, Sánchez-Dieguez E  
Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA); La Habana, Cuba  
Email: diaglisida@infomed.sld.cu.

### RESUMEN

En Cuba, una de las estrategias de seguridad para disminuir el riesgo de transmisión viral asociado al uso de productos hemoderivados, es el estudio de marcadores virales para el Virus de la Hepatitis B, Virus de la Hepatitis C y Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipos 1 y 2. LISIDA es el laboratorio designado por el Centro Estatal para el Control de Medicamentos, Equipos y Dispositivos médicos (CECMED) para llevar a cabo estas funciones y contaba para ello con ensayos validados de la casa comercial Biomérieux, los cuales fueron recientemente descatalogados. Por esta razón se realizó un estudio de los productos similares disponibles en el mercado y se adquirieron nuevos estuches de la casa comercial CTK BIOTECH: RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test, HBsAg ELISA Kit y RecombiLISA HCV Ab Test. El objetivo de este trabajo fue validar los estuches para demostrar que cumplen con los parámetros establecidos para su uso en la certificación de productos hemoderivados. Se estudiaron 21 lotes de productos hemoderivados aprobados en el Laboratorio de Control de la Calidad del LISIDA empleando los ensayos de Biomeriëux Vironostika HIV, Heparostika HBsAg Ultra y Heparostika Anti HCV vigentes; 27 lotes de productos hemoderivados recibidos entre los meses de agosto y octubre de 2016; 5 paneles de referencia para el sistema RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test y uno para cada uno de los sistemas HBsAg ELISA Kit y RecombiLISA HCV Ab Test. Como parámetros a medir se tuvieron en cuenta el cumplimiento de las especificaciones del fabricante, la especificidad y la sensibilidad. La totalidad de los ensayos cumplieron con las especificaciones y se obtuvieron índices de sensibilidad y especificidad superiores al 99 %. Los resultados obtenidos muestran la factibilidad del empleo de estos sistemas para el estudio de marcadores virales durante la certificación de productos hemoderivados.

**Palabras clave:** hemoderivados, marcadores virales, VIH, HBsAg, HCV, validación.

## INTRODUCCIÓN

En Cuba, una de las estrategias de seguridad para disminuir el riesgo de transmisión viral asociado al uso de productos hemoderivados, es el estudio de marcadores virales para el virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2 (VIH-1/2), lo cual constituye una etapa fundamental en el aseguramiento de la calidad durante la fabricación<sup>1</sup>.

LISIDA es el laboratorio designado por el CECMED para llevar a cabo estas funciones y contaba para ello con ensayos validados, de los sistemas Vironostika HIV Ag/Ab, Hepanostika HBsAg Ultra y Hepanostika Anti HCV, de la casa comercial Biomérieux, los cuales fueron recientemente descatalogados. Por esta razón se realizó un estudio de los productos similares en el mercado y se adquirieron nuevos estuches de la casa comercial CTK BIOTECH: RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test, HBsAg ELISA Kit y RecombiLISA HCV Ab Test; los cuales se validaron para demostrar que cumplen con los parámetros establecidos para su uso en la certificación de productos hemoderivados<sup>2</sup>.

## OBJETIVOS

### *General*

Validar los sistemas RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test, HBsAg ELISA Kit y RecombiLISA HCV Ab Test de CTK BIOTECH para demostrar que cumplen los parámetros establecidos para su uso en la certificación de productos hemoderivados.

*Específicos:* Para los tres sistemas:

- Determinar el cumplimiento de los parámetros de validación de los ensayos, establecidos por el productor.
- Evaluar la especificidad diagnóstica
- Estudiar la sensibilidad analítica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Aspectos generales y regulatorios*

Para la realización de este estudio se siguieron los aspectos establecidos por las agencias reguladoras nacionales e internacionales <sup>3,4</sup>.

Muestras: *Muestras de productos Hemoderivados:* Se estudiaron 21 lotes de productos hemoderivados aprobados en el Laboratorio de Control de la Calidad del LISIDA empleando los ensayos de Biomeriéux Vironostika HIV, Heparostika HBsAg Ultra y Heparostika Anti HCV; divididos en 6 lotes de IFA, 6 graneles de Inmunoglobulina Humana al 5 %, 3 graneles de Inmunoglobulina Humana al 10 % y 6 productos finales de Albúmina Humana al 20 %.

Se estudiaron además 27 lotes de productos hemoderivados recibidos entre los meses de agosto y octubre de 2016, divididos en 14 lotes de IFA, 6 graneles de Inmunoglobulina Humana al 5 %, 6 productos finales de Albúmina Humana al 20 % y 1 Inmunoglobulina humana del tétanos líquida.

Estos lotes fueron ensayados por los sistemas RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test, HBsAg ELISA Kit y RecombiLISA HCV Ab Test de CTK BIOTECH acorde a los algoritmos de trabajo para la certificación de productos hemoderivados del LISIDA <sup>5</sup>.

Muestras clínicas: Se utilizaron 10 muestras clínicas reactivas a VIH, 10 muestras clínicas reactivas a HBsAg y 10 reactivas a HCV para los ensayos de sensibilidad diagnóstica de los sistemas.

Paneles de referencia: Para el ensayo RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test, se emplearon los siguientes paneles de referencia:

*Panel 1: HIV-1 Seroconversion Panel N PRB 914 (5 muestras)*

*Panel 2: HIV-1 Seroconversion Panel BB PRB 952 (6 muestras)*

*Panel 3: HIV-1 Seroconversion Panel PRB 968 (10 muestras)*

*Panel 4: Muestras reactivas 12, 15, 18, 19 y 20 del Anti-HIV 1 Low Titer Performance Panel PRB 109 con reactividad contra el VIH-1 cerca del límite de sensibilidad de las pruebas de pesquisaje.*

*Panel 5: Panel de 10 muestras de plasma positivas al VIH-1, confirmadas y subtipadas en LISIDA, pertenecientes a diferentes subtipos del grupo (M) y formas recombinante circulantes (CRF) en Cuba.*

Para el ensayo HBsAg ELISA Kit, se empleó un panel de desempeño producido por LISIDA, conformado por 20 muestras positivas a HBsAg, caracterizadas por PCR Cobas Ampliscreen HBV, UMELISA HBsAg PLUS y Hepanostika HBsAg Ultra. (Se adjunta su caracterización)

Para el ensayo RecombiLISA HCV Ab Test, se empleó un panel de desempeño producido por LISIDA, conformado por 20 muestras positivas a HCV, caracterizadas por PCR Cobas Ampliscreen HCV, UMELISA HCV y Hepanostika Anti HCV.

Principales materiales y equipos que se emplearon en la validación:

- Micropipetas Eppendorf monocanales de 0,1 a 10  $\mu$ L y de 10 a 100  $\mu$ L.
- Micropipetas Eppendorf de 30 a 300  $\mu$ L, de 8 y 12 canales.
- Puntas para micropipetas.
- Viales Eppendorf de 1,5 mL.
- Agitador de tubos Vibrofix VF1.
- Cámara fría de 2 a 8 °C.
- Incubadora Shaker 50X a 37 °C.
- Lector de Placas SUMA PR-621 con filtros para la lectura absorbancia a 450 nm.

Diagnosticadores a validar:

RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test (CTK BIOTECH, EEUU): Ensayo de ELISA tipo doble sándwich antígeno/ anticuerpo para la detección cualitativa de antígeno P24 del VIH-1 y anticuerpos contra el VIH-1/2 incluyendo subtipo O, en suero o plasma humano.

HBsAg ELISA Kit (CTK BIOTECH, EEUU): Ensayo de ELISA para la detección cualitativa del antígeno de superficie del VHB en suero o plasma humano.

RecombiLISA HCV Ab Test (CTK BIOTECH, EEUU): Ensayo de ELISA indirecto para la detección cualitativa de anticuerpos contra el VHC en suero o plasma humano.

Metodología: En los ensayos se siguieron estrictamente las indicaciones de uso recomendadas por el fabricante.

El algoritmo de ensayo fue:

- ✓ Ensayos de las muestras de hemoderivados por duplicado; muestras clínicas, ensayos de límite de detección y paneles de referencia de forma simple.
- ✓ Las muestras no concordantes con el resultado esperado teniendo en cuenta su caracterización, se repitieron por duplicado.
- ✓ Las discrepancias fueron resueltas con los sistemas DAVIH BLOT (VIH-1); DAVIH BLOT-VIH-2; INNOLIA HCV Score y UMELISA HBsAg Confirmatory.

Cumplimiento de las Especificaciones: Se analizaron los resultados de los controles Positivos y Negativos según los parámetros establecidos por el fabricante para cada ensayo:

RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test:	$CPx \text{ Ab} \geq 0,80$
	$CPx \text{ P24} \geq 0,80 \text{ CNx} \leq 0,10$
	$Vc = CNx + 0,10$
HBsAg ELISA Kit:	$CPx \geq 0,50$
	$CNx \leq 0,10$
	$Vc = CNx \times 2,1$
RecombiLISA HCV Ab Test:	$CPx \geq 0,80$

$$CNx \leq 0,10$$

$$Vc = CNx + 0,15$$

Donde: CP: control positivo; CPx: media del control positivo; CN: control negativo; CNx: media del control negativo; Vc: valor de corte.

*Especificidad:* Se calculó a partir del análisis de todas las muestras negativas empleadas. Se tomó como criterio de aceptación que deben obtenerse resultados iguales o superiores al 98 %.<sup>3,4</sup>

*Sensibilidad Analítica:* Para analizar la sensibilidad analítica, se simuló la posibilidad de que una muestra positiva de cada entidad viral (VIH, VHB y VHC) entrara en el proceso productivo; para esto realizamos los cálculos de cuánto representaría una donación positiva basados en el número de donaciones individuales que conforman un lote de producto y se escogió una representación de cada tipo de producto a estudiar (IFA 1/5 000, graneles 1/5 600, albúmina sin diluir e inmunoglobulinas totales y específicas 1/833).

Se procedió entonces a contaminar todas las muestras y posteriormente se realizó la dilución de trabajo, con cloruro de sodio al 0,9 %, de las inmunoglobulinas totales y específicas, teniendo en cuenta la concentración de las mismas para determinar la dilución más apropiada con el fin de lograr una concentración de proteínas lo más aproximada a la existente en el suero humano (13-15 mg/mL).

Las muestras fueron ensayadas en los tres sistemas a validar.

Para el caso del RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test, se analizaron también los resultados de cada panel de seroconversión (paneles 1 al 3), para determinar la capacidad de detección temprana del sistema.

*Sensibilidad Diagnóstica:* Para el sistema RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test se calculó a partir de las muestras positivas correspondientes a los paneles 4, 5 y las muestras clínicas reactivas a VIH. Para los sistemas HBsAg ELISA Kit y RecombiLISA HCV Ab Test, se tuvieron en cuenta las muestras correspondientes a los paneles de desempeño y las muestras clínicas

reactivas a HBsAg y HCV respectivamente. Se tomó como criterio de aceptación que deben obtenerse resultados iguales o superiores al 99 % <sup>3,4</sup>.



## RESULTADOS

*Cumplimiento de las Especificaciones.* En todos los ensayos los controles positivos y negativos cumplieron con las especificaciones.

*Especificidad.* Los 48 lotes de productos hemoderivados ensayados en todos los sistemas fueron no reactivos para una especificidad de 100 %. Estos resultados cumplen con el criterio de aceptación y están acordes a lo descrito para la validación de ensayos de identidad <sup>2</sup>.

*Sensibilidad Analítica.* En los tres sistemas, todas las muestras ensayadas en dilución de trabajo resultaron reactivas, por lo que se demostró que son capaces de detectar una bolsa de plasma reactiva dentro de la mezcla de plasmas que conforman el producto en sus diferentes etapas dentro del proceso.

En el RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test, las dos últimas muestras de cada panel de seroconversión (paneles 1 al 3), resultaron reactivas, lo cual concuerda con su caracterización de referencia y demuestra la capacidad de detección temprana del sistema.

*Sensibilidad Diagnóstica.* Para todos los ensayos las muestras positivas resultaron reactivas, por lo que la sensibilidad diagnóstica resultó del 100 %, acorde a lo planteado por el CECMED <sup>2</sup>.

## CONCLUSIONES

Los resultados muestran la factibilidad del empleo de los sistemas RecombiLISA HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test, HBsAg ELISA Kit y RecombiLISA HCV Ab Test para el estudio de marcadores virales durante la certificación de productos hemoderivados.

## RECOMENDACIONES

Recomendamos estudiar otros sistemas comerciales que garanticen la sostenibilidad de la certificación con otras opciones.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kingham R; Klassa G and Hessler K. Biological Drug Products: Development and Strategies, First Edition. Edited by Wei Wang and Manmohan Singh. 2014; 102.
2. S Ghosh, BVV Ravikumar, B Mahanti; An Updated & Modern Concept of Validation; PharmaTutor; 2015; 3(6) 16-20.
3. FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. 2001.
4. CECMED. Regulación 41/2007. Validación de métodos analíticos. Cuba. 2007.
5. PNO 01-009 CICDC. Algoritmos de trabajo para la certificación de productos hemoderivados. Ed. 06, 2014, Anexo 1.

