

# Desarrollo, validación y aplicación de un nuevo ELISA para el control del proceso del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B recombinante

✉ Alberto Leyva, Julio C Sánchez, Lissette López, Milagros Font, Tatiana González, Bárbara Pérez, Neyda Hernández, Yamila Martínez, Annette Pereira, Ivonne Rodríguez

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB  
Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 10 600, La Habana, Cuba  
E-mail: alberto.leyva@cigb.edu.cu

## RESUMEN

Se desarrolló y validó un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) de tipo sándwich para la cuantificación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (VHB), obtenido por vía recombinante de la levadura metilotrófica de *Pichia pastoris*. La cuantificación se efectuó con el anticuerpo monoclonal (AcM) CB.Hep-1, utilizado como inmunoligando para su purificación. Los estudios de validación siguieron la guía ICH Q2 (R1) y la regulación No. 41, de 2007 del Cecmed. Se cuantificaron hasta 11.9 ng/mL, y se analizaron los parámetros de linealidad, especificidad, precisión y exactitud. El AcM CB.Hep-1, usado como recubrimiento y conjugado en el ELISA, fue específico en el reconocimiento del antígeno de superficie del VHB (AgsHB) recombinante, por lo que la cuantificación fue exacta. En el análisis de varianza para el ensayo de interferencia, el valor de probabilidad para cada tampón de las muestras del proceso de producción fue mayor que 0.1, para un nivel de confianza de 99%. La variabilidad intraensayo fue entre 0.77 y 7.47%, e interensayo fue entre 1.19 y 19.41%. Para cada muestra fue menor del 10 y el 20%, respectivamente. Se obtuvo un recobrado entre 98.18 y 100.31%, con un coeficiente de variación por debajo del 20%. El ELISA es específico para este anticuerpo monoclonal en el rango de concentraciones estudiadas. La curva de calibración es lineal entre 191.7 y 11.9 ng/mL. Por su precisión, especificidad y exactitud, este ELISA se convierte en una poderosa herramienta en el control del proceso de la vacuna recombinante contra el VHB.

Palabras clave: AgsHB, validación, control de procesos, ELISA

*Biotecnología Aplicada 2011;28:221-227*

INVESTIGACIÓN

## ABSTRACT

**Development, validation and implementation of a new ELISA to process control of the recombinant Hepatitis B surface antigen.** The present work describes the development and validation of a sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantifying the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg), obtained from a recombinant strain of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. It is based on monoclonal antibody CB.Hep-1, normally employed as a ligand for the purification of HBsAg. Validation followed the guidelines of ICH Q2 and CECMED regulation No. 41 from 2007. Parameters such as linear working range, specificity, precision and accuracy were analyzed. The assay has a lower quantification limit of 11.9 ng/mL. Monoclonal antibody CB.Hep-1, used both for coating and as a conjugate during the ELISA, specifically bound recombinant HBsAg with excellent accuracy. An analysis of variance for the interference study yielded a probability, for each process control sample type/buffer combination, higher than 0.1, for a confidence level of 99%. Intra-assay variability ranged from 0.77 to 7.47%, and inter-assay variability ranged from 1.19 to 19.41%, always staying, for each sample, below 10 and 20% respectively. Recovery ranged from 98.18 to 100.31%, with a variation coefficient under 20%. The ELISA is specific for this monoclonal antibody within the range of studied concentrations, and has a linear response for antigen concentrations from 191.7 to 11.9 ng/mL. Given its precision, specificity and accuracy, this ELISA is a powerful tool for process control during the production of the recombinant vaccine against HBV.

Keywords: HBsAg, validation, Process control, ELISA

## Introducción

La hepatitis B constituye un problema de salud mundial. El virus de la hepatitis B (VHB) afecta aproximadamente a unos trescientos cincuenta millones de portadores en el mundo y es responsable en manera directa o indirecta de más de medio millón de muertes anuales [1]. La producción de vacunas por técnicas de ADN recombinante ha posibilitado expresar el gen S del antígeno de superficie del virus (AgsHB) en varios hospederos: organismos procarióticos [2], levaduras [3, 4], células de mamíferos [5, 6], células de insectos [7] y plantas [8], lo que constituye una eficiente fuente de protección contra este problema de salud mundial.

El AgsHB es una proteína bien caracterizada proveniente de la envoltura del VHB. Se ensambla en una partícula subviral muy estable, de 24 nm, compuesta por 100 unidades o más, ensambladas por múltiples puentes disulfuros intramoleculares e intermoleculares.

El Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de La Habana, desde la década de 1990 produce un ingrediente farmacéutico activo (IFA) de una vacuna obtenida de la levadura metilotrófica de *Pichia pastoris*, que protege contra la infección del VHB. Esta se comercializa bajo la marca de Heberbiovac HB por la empresa Heberbiotec S.A., Cuba [9].

1. Centers for Disease Control and Prevention. Achievements in public health: hepatitis B vaccination. United States, 1982-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002;51(2):529-52.

2. Burrell CJ, Mackay P, Greenaway PJ, Hofschneider PH, Murray K. Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322. *Nature.* 1979;279(5708):43-7.

3. Miyahara A, Toh-e A, Nozaki C, Hamada F, Ohtomo N, Matsubara K. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80(1):1-5.

La purificación del AgsHB incluyó varios pasos cromatográficos. La cromatografía de inmunoafinidad, que tiene como base la interacción del AgsHB con el anticuerpo monoclonal (AcM) de ratón CB.Hep-1, es el paso principal del proceso de producción del antígeno [10-12]. Esta remueve la mayoría de las proteínas contaminantes y aporta ventajas en la selectividad, el recobrado, la pureza y el poder de concentración [13].

El AcM CB.Hep-1 reconoce una secuencia aminoácida localizada en el determinante antigénico 'a' del AgsHB [14]. El reconocimiento y la forma multimérica de la partícula viral permitió estandarizar un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), de tipo sándwich, que emplea este único anticuerpo para la captura y detección. Este ELISA se emplea durante la producción del AgsHB para su cuantificación, desde la ruptura celular hasta la obtención del IFA. La validación de este método de contenido o potencia [15, 16] es un requerimiento en la industria biofarmacéutica para garantizar la confiabilidad de los resultados.

Se desarrolló, validó y aplicó un ELISA sándwich con el AcM CB.Hep-1 para el control del proceso de producción del AgsHB, que permitió monitorear y el recobrado de cada uno de los pasos, a partir de los valores de concentración de las muestras, con precisión y exactitud, según lo establecido por las regulaciones internacionales vigentes.

## Materiales y métodos

### Enzimas y reactivos químicos

Se emplearon reactivos y materiales suministrados por Sigma (EE.UU.), así como la enzima peroxidasa de rábano picante tipo VI-A, para la conjugación. Se utilizaron de acuerdo con las especificaciones establecidas por los productores.

### Reactivos biológicos

El material de referencia empleado fue el antígeno AgsHB (código: 11-0306), preparado por el Grupo de Estabilidad y Materiales de Referencia de Control de la Calidad, del CIGB. El anticuerpo de recubrimiento fue el anticuerpo monoclonal CB.Hep-1 (código: 1AF0418), preparado y suministrado por el Departamento de Producción de Anticuerpos Monoclonales, del propio CIGB. Como conjugado se empleó el anticuerpo monoclonal CB.Hep-1 conjugado a peroxidasa (código: Hep-1-4001), por el método del peryodato, según Nakane y Kawaoi [17].

### Muestras y tampones del proceso de producción

Las muestras para los experimentos proceden del proceso de producción del AgsHB. Se analizaron las muestras representativas de cada etapa del proceso: sobrenadante de ruptura (Rupt), sobrenadante de la precipitación ácida (SH), concentrado de celite filtrado (CCT), fracción no retenida de intercambio iónico negativo ajustado (ION), eluato de inmunoafinidad (EIAF), eluato de intercambio iónico positivo 400 mM (IIP) e ingrediente farmacéutico activo (IFA). Los tampones correspondientes a cada una de las muestras del proceso de producción fueron: Rupt (Tris

20 mM, EDTA 5 mM (p/v), KSCN 3 M, NaCl 0.3 M; pH 7), SH (Tris 20 mM, EDTA 5 mM (p/v), KSCN 3 M, NaCl 0.3 M; pH 8), CCT (Tris 20 mM, EDTA 3 mM, NaCl 250 mM), ION (Tris 20 mM, EDTA 3 mM, NaCl 1 M), EIAF (Tris 20 mM, EDTA 3 mM, NaCl 0.4 M; pH 7.2) e IFA (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 8 mM, NaCl 0.14 M; pH 6.7).

### Procedimiento ELISA

Se recubrieron placas de 96 pocillos de poliestireno MaxiSorp (Nunc) con 100 µL del anticuerpo monoclonal CB.Hep-1 a una concentración de 10 µg/mL en tampón de recubrimiento carbonato-bicarbonato de sodio 0.05 M, pH 9.6 (100 µL/pocillo) y se incubaron durante 20 min a 50 °C. La curva de calibración se preparó con diluciones seriadas del estándar en el tampón del ensayo (PBS 1X, BSA 0.2%, Tween 20 diluido ¼ 0.05%), al igual que el control y las muestras en su dilución de trabajo, y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se lavaron las placas y se añadieron 100 µL del mismo anticuerpo conjugado con peroxidasa, diluido 1/20 000, para que reaccionaran durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. La reacción se reveló con ortofenildiamina (OPD) como sustrato y 0.015% de H<sub>2</sub>O en tampón de ácido cítrico a pH 5.5. Pasados 10 min, se detuvo la reacción con 50 µL de 2 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e inmediatamente se leyó a 492 nm en un lector de placas (Labsystem, Helsinki, Finlandia).

### Determinación de la concentración de proteínas totales

La concentración de proteínas totales en las muestras del proceso de producción del AgsHB se determinó por el método de Bradford, con pequeñas modificaciones, de acuerdo con Zor y Selingue [18]. La muestra se aplicó en placas de 96 pocillos, a la dilución establecida. Inmediatamente se añadió el reactivo de Coomassie y se incubó a temperatura ambiente, durante 10 minutos, para que ocurriera la unión de este con las proteínas. Luego, se midió la absorbancia a 620/450 nm en un lector de placa (Labsystem, Helsinki, Finlandia). La concentración de proteínas totales se calibró contra albúmina de suero bovino, usada como material de referencia. El coeficiente de regresión (r<sup>2</sup>) de la curva de calibración fue mayor que 0.99.

### Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental de superficie de respuesta para optimizar la concentración de recubrimiento del AcM CB.Hep-1, el tiempo y la temperatura de concentración para el ELISA sándwich. Los valores probados se transformaron y codificaron como -1, 0 y 1 para el cálculo estadístico. En este estudio, el diseño del experimento contiene tres tratamientos, incluyendo un punto central y cuatro réplicas para cada uno. Se creó y analizó el modelo polinomial de segundo orden mediante el programa STATGRAPHICS centurión XV.1 (1994-2000). Las concentraciones del AcM CB.Hep-1 probadas fueron 1, 5 y 10 µg/mL. La temperatura y el tiempo de incubación analizadas fueron 4 °C/14 horas, 37 °C/1 hora y 50 °C/20 minutos.

4. Gellissen G, Janowicz ZA, Weydemann U, Melber K, Strasser AW, Hollenberg CP. High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol Adv*. 1992;10(2):179-89.

5. Hsiung N, Fitts R, Wilson S, Milne A, Hamer D. Efficient production of hepatitis B surface antigen using a bovine papilloma virus-metallothionein vector. *J Mol Appl Genet*. 1984;2(5):497-506.

6. Holzer GW, Mayrhofer J, Leitner J, Blum M, Webersinke G, Heuritsch S, et al. Overexpression of hepatitis B virus surface antigens including the preS1 region in a serum-free Chinese hamster ovary cell line. *Protein Expr Purif*. 2003;29(1):58-69.

7. Kang CY, Bishop DH, Seo JS, Matsuura Y, Choe M. Secretion of particles of hepatitis B surface antigen from insect cells using a baculovirus vector. *J Gen Virol*. 1987;68(Pt 10):2607-13.

8. Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(11):5335-40.

9. Muzio VL, Pentón E, Palou M, Fontirrochi G, Nazábal M, González MJ, et al, inventors; Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, assignee. Method for obtaining recombinant surface antigen of hepatitis B virus (HEP B) of higher immunogenic capacity and use thereof in a vaccine preparation. European Patent EP480525. 1992 Apr 15.

10. Agraz A, Duarte CA, Costa L, Pérez L, Páez R, Pujol V, et al. Immunoaffinity purification of recombinant hepatitis B surface antigen from yeast using a monoclonal antibody. *J Chromatogr A*. 1994;672(1-2):25-33.

11. Páez R, Agraz A, Herrera L. The recovery of the hepatitis B virus surface antigen (AgsHB) from a recombinant *P. pastoris* strain, disruption and precipitation studies. *Acta Biotechnol*. 1993;13:117-22.

12. Pérez L, López S, Beldarrain A, Arenal D, Pentón E. Purification of recombinant hepatitis B surface antigen (rec-HBsAg) from *P. pastoris*: a process development study. In: Galindo E, Ramirez OT, editors. *Advances in Bioprocess Engineering*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1994. p. 527-34.

13. Hardy E, Martínez E, Diago D, Díaz R, González D, Herrera L. Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *Biotechnol*. 2000;77(2-3):157-67.

14. Fernández de Cossio ME, Díaz T, Galván A, Valdéz R, González E, Ayala M, et al. Antigen recognition characteristics and comparative performance in immunoaffinity purification of two monoclonal antibodies specific for the hepatitis B virus surface antigen. *J Biotechnol*. 1997;56(2):69-80.

15. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Regulación No. 41-2007: Validación de Métodos Analíticos. *Ámbito Regulador*. 2007 Mar 3;(53):1-14.

16. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. ICH; 2005 Nov.

**Validación del método**

**Linealidad y rango de trabajo**

La concentración del material de referencia se evaluó en un rango amplio: entre 1.50 y 1500 ng/mL. Para obtener el rango lineal de la curva de referencia se utilizó el método del mínimo de los cuadrados. Se analizaron el coeficiente de regresión (r<sup>2</sup>), la pendiente y el intercepto de cada curva.

Para determinar la relación entre la concentración del analito y la respuesta (absorbancia a 492 nm), se trazó una curva de calibración con el material de referencia en las concentraciones: 11.9, 23.9, 47.9, 95.8, 191.7 y ng/mL, con dos réplicas para cada punto y cinco ensayos independientes, como mínimo. El rango de trabajo se estableció entre el valor más alto y el más bajo obtenido con precisión (menor que 20%) y exactitud (recobrado entre 80-120%).

**Especificidad**

Se preparó la curva patrón en el tampón del ensayo (PBS 1X, 0.2% BSA, 0.05% Tween 20) y en los diferentes tampones en las muestras del proceso de producción, reconstituida con los contaminantes de cada muestra (levadura negativa). Cada curva de referencia se trazó a la dilución de trabajo de la muestra correspondiente. Se comparó la pendiente y el intercepto de la curva de referencia del ensayo y de otra curva, con los contaminantes de la muestra, mediante un análisis de la varianza (ANOVA) (la probabilidad fue mayor que 0.1). Además se compararon el coeficiente de regresión (r<sup>2</sup>), la absorbancia de los fondos y la cuantificación del control positivo del ensayo.

**Exactitud**

Se calculó el recobrado para cada muestra del proceso de producción con tres niveles de concentración conocida del material de referencia (95.8, 47.9 y 23.9 ng/mL). Se determinó el valor de la *t* de Student con un nivel de confianza del 95% para cada muestra. Además, se calculó el intervalo de confianza para el valor esperado.

**Precisión**

Se estudió el comportamiento de las muestras del proceso de producción con diferentes determinaciones. Se calculó el coeficiente de variación (CV) entre las réplicas (3) en un ensayo (repetibilidad), y la variabilidad, durante tres días y diferentes analistas (precisión intermedia). La reproducibilidad se determinó mediante una correlación entre un ELISA del laboratorio de control de calidad (CC) y el nuevo ELISA validado del laboratorio de control de procesos (CP). Para ello se escogieron 15 determinaciones de diferentes IFA y se tomó como criterio de aceptación un *r* mayor que 0.90.

**Resultados**

**Optimización del ensayo**

Se desarrolló un ELISA tipo sándwich con el anticuerpo monoclonal CB.Hep-1, utilizado como inmunoligando en la purificación del antígeno de superficie de la hepatitis B, producido en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana. Este AcM re-

conoce la región denominada ‘determinante a’: zona de la molécula que constituye la secuencia inmunodominante e inmunoprotectora del VHB (Figura 1). El ensayo se basó en la captura y detección del antígeno con el AcM CB.Hep-1. Para disminuir la cantidad de experimentos en la estandarización del ensayo, se utilizó un diseño de superficie de respuesta [19]. Para esto se probaron las variables: concentración de recubrimiento, tiempo y temperatura de incubación, medidas en valores de absorbancia. Sus interacciones se evaluaron usando el valor de probabilidad. En el ANOVA se obtuvo un valor de probabilidad mayor que 0.05, que indicó que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95%. Los resultados demuestran que la mejor condición de trabajo se obtuvo con una concentración de recubrimiento de 10 µg/mL, incubado durante 20 minutos a 50 °C. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Absorbancia} = 0.64 + 0.13 \text{ Conc} - 0.028 \text{ Temp} - 0.012 \text{ Conc}^2 + 0.002 \cdot \text{Conc} \cdot \text{Temp} + 0.00026 \cdot \text{Temp}^2$$

**Validación**

**Linealidad y rango de trabajo**

Se ajustaron los valores de absorbancia con los de concentración del patrón de referencia mediante el método de los mínimos cuadrados lineales. Se analizó un amplio rango de concentración del material de referencia, entre 1.45 y 1550 ng/mL, para determinar la linealidad del ensayo (Figura 2A). La curva patrón (Figura 2B) representa la media de cinco curvas de calibración, para la determinación del rango lineal del ensayo (191.7, 95.8, 43.5, 23.5 y 11.9 ng/mL). En el ANOVA, el valor de probabilidad asociada a F fue inferior a 0.01, lo que demuestra una relación estadísticamente significativa entre la concentración y la absorbancia, con 95% de confianza (Figura 2C). El coeficiente de regresión (r<sup>2</sup>) indica que el modelo ajustado explica el 98.39% de la variabilidad de los valores de la absorbancia, que fue mayor que 0.98. Los valores de absorbancia de los fondos en cada ensayo fue menor que 0.05. El límite de cuantificación fue 11.9 ng/mL, determinado con precisión y exactitud (coeficiente de variación igual a 8.6% y 94% de recobrado).

**Especificidad**

Se compararon las pendientes y los interceptos de la curva de referencia, preparada en el tampón del ensayo y en la solución tampón del proceso y los con-

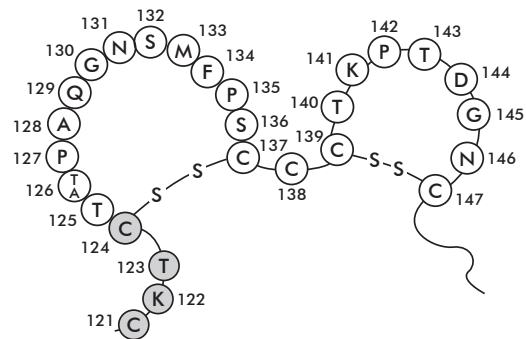


Figura 1. Representación esquemática del ‘determinante a’, y la secuencia aminoacídica reconocida por el AcM CB.Hep-1 en el AgsHB (aminoácidos sombreados en gris).

17. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem.* 1974;22(12):1084-91.

18. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996;236(2):302-8.

19. Myers RH, Montgomery DC. Response surface methodology: process and process optimization using designed experiments. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 2002.

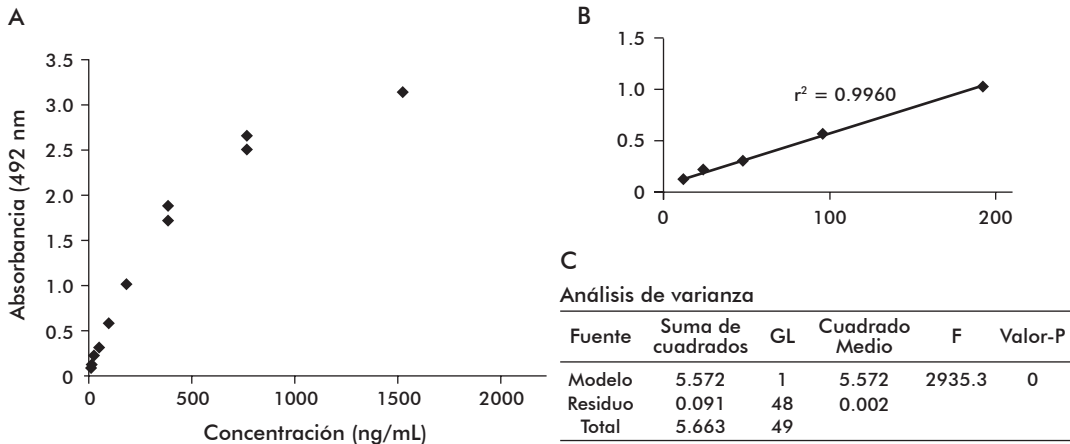


Figura 2. Linealidad del ELISA para la cuantificación del AgsHB. A) Amplio rango de concentración utilizado. B) Curva de linealidad. C) ANOVA para demostrar la linealidad del sistema.

taminantes de levadura, en cada muestra del proceso, a la menor dilución a la que se emplea este tampón en el ensayo, mediante un ANOVA. La probabilidad para cada tampón de las muestras del proceso de producción fue mayor que 0.1 para un nivel de confianza de 99% (Tabla 1). Los parámetros en cada curva patrón estuvieron entre los límites calculados, y no hubo diferencias significativas entre las especificaciones establecidas para este tipo de ensayo. Los resultados demuestran que las matrices de las muestras del proceso no interfieren en la cuantificación del AgsHB en el ELISA con el AcM CB.Hep-1.

**Exactitud**

La exactitud se demostró mediante el cálculo del recobrado en tres niveles de concentración, según la regulación No. 41 del 2007 del Cecmed sobre “Validación de métodos analíticos” y la Regulación ICH Q2 (R1) del 2005 [15, 16]. Los porcentajes de recuperación en cada muestra analizada estuvieron en el rango establecido: entre 80 y 120%. El valor de la prueba t de Student en cada una, fue inferior al tabulado. Estos resultados demuestran que el ensayo ofrece resultados ciertos de concentración de las muestras, ya que el valor que se obtuvo está en el intervalo de confianza calculado para cada muestra analizada (Tabla 2).

**Precisión**

Para determinar la precisión del ensayo se utilizaron todas las muestras del proceso de producción empleadas en el estudio de validación de la técnica. El estudio de repetibilidad mostró que los resultados de la técnica tienen una variabilidad menor del 10%. Los resultados del ensayo de precisión intermedia, por analista y entre los analistas por tipo de muestra, se resumen en la tabla 3. El CV fue menor del 20%.

Para completar la validación del ELISA, se hizo un estudio colaborativo de reproducibilidad con el laboratorio de control de la calidad. Para ello se cuantificaron lotes diferentes de IFA, por los laboratorios de CP y CC, y se correlacionaron. La figura 3 representa la relación entre las determinaciones por el ELISA en los laboratorios de CP y de CC, utilizando el AcM CB.Hep-1. En la tabla 4 se compendian los resultados que explican la relación entre ambos métodos, y se

Tabla 1. Especificidad del AcM CB.Hep-1 por comparación de diferentes curvas patrones realizadas en los tampones de las muestras del proceso de producción

Tampones*	Pendiente	Intercepto	p/pendiente	p/intercepto	r <sup>2</sup>	Fondos	Control positivo (µg/mL)
Rupt	0.0048	0.0040	0.563	0.486	0.9914	0.045	1184.28
SH	0.0049	0.0043	0.536	0.971	0.9937	0.039	1189.53
CCT	0.0042	0.0041	0.453	0.231	0.9936	0.048	1088.16
ION	0.0045	0.0038	0.692	0.948	0.9846	0.045	1398.19
EIAF	0.0045	0.0039	0.830	0.679	0.9904	0.046	1410.22
IIP	0.0047	0.0034	0.306	0.706	0.9889	0.039	1277.33
IFA	0.0045	0.0034	0.932	0.426	0.9944	0.047	1276.58
Rangos/límites	0.0063-0.0043	0.0044-0.0028	p>0.1		r <sup>2</sup> > 0.98	< 0.100	928.93-1483.07

\*Tampones de cada uno de los pasos del proceso. Rupt: sobrenadante de ruptura; SH: sobrenadante de la precipitación ácida; CCT: concentrado de celite filtrado; ION: fracción no retenida de intercambio iónico negativo ajustado; EIAF: eluato de inmunofinidad; IIP: eluato de intercambio iónico positivo 400 mM; IFA: ingrediente farmacéutico activo.

Tabla 2. Exactitud del ensayo, según recobrado de cada muestra del proceso de producción en tres niveles de concentración

Pasos del Proceso*	Valor esperado	Rango alto de concentración (ng/mL)			t Calculada
		Valor calculado	Intervalo	% Recobrado	
Rupt	121.2	122.8	120-125	101.25	1.96
SH	171.3	177.3	168-186	103.48	2.28
CCT	94.8	106.3	95-118	112.13	3.46
ION	107.9	114.6	109-120	106.24	4.13
EIAF	130.0	131.6	127-136	101.24	1.23
IIP	184.9	199.1	187-211	107.71	4.07
IFA	142.5	156.0	145-167	109.42	4.21
Rango medio de concentración (ng/mL)					
	Valor esperado	Valor calculado	Intervalo	% Recobrado	t Calculada
Rupt	121.2	107.5	101-114	106.33	3.64
SH	148.3	140.3	130-151	94.64	-2.62
CCT	78.1	75.5	71-80	96.62	-1.93
ION	90.3	89.9	85-94	99.52	-0.34
EIAF	111.3	105.4	98-113	94.70	-2.65
IIP	165.2	169.9	161-178	102.83	1.88
IFA	122.0	123.4	121-126	101.15	1.95
Rango bajo de concentración (ng/mL)					
	Valor esperado	Valor calculado	Intervalo	% Recobrado	t Calculada
Rupt	90.8	91.3	90-92	100.60	1.65
SH	136.7	129.8	121-139	94.95	-2.63
CCT	67.7	64.1	57-68	94.78	-1.81
ION	81.3	80.9	79-83	99.51	-0.75
EIAF	102.2	92.3	81-104	90.38	-3.00
IIP	154.3	156.7	144-170	101.54	0.64
IFA	110.7	106.5	97-116	96.28	-1.55
t tabulada (n-1, 0.05)	4.30				

\*Rupt: sobrenadante de ruptura; SH: sobrenadante de la precipitación ácida; CCT: concentrado de celite filtrado; ION: fracción no retenida de intercambio iónico negativo ajustado; EIAF: eluato de inmunofinidad; IIP: eluato de intercambio iónico positivo 400 mM; IFA: ingrediente farmacéutico activo.

fija el modelo lineal como control. La ecuación para el modelo fijado fue:

$$CP = 1.22984 \times CC - 0.0967221$$

Debido a que el valor de probabilidad asociado a F es menor que 0.01, y que hubo 99% de confianza, se concluye que existe una relación estadísticamente significativa entre ambos métodos.

El coeficiente de regresión indica que el modelo seleccionado explica la variabilidad del ELISA en el CP con respecto al de CC. El coeficiente de correlación igual a 0.9146 indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado muestra una desviación estándar de los residuos de 0.147. Este valor se puede utilizar para construir los límites para nuevas observaciones. Los resultados demuestran que no existen diferencias significativas en la cuantificación de los IFA, entre los dos laboratorios.

**Aplicación del ELISA en el análisis del recobrado del proceso de producción. Gráfico de control**

Para evaluar la aplicabilidad del ELISA, se implementó en el control del proceso de producción del AgsHB. El análisis del recobrado del proceso mediante este ELISA y de conjunto con la determinación de proteínas por el método modificado de Bradford [18], se muestra en la figura 4. Para el análisis se tomaron los valores de cinco lotes del proceso, a los que se determinó el CV entre lotes. En cada paso fue menor del 25%. Ello demuestra la consistencia del proceso de producción y la posibilidad del ELISA de analizar adecuadamente la concentración de cada muestra del proceso de producción. La verificación continuada del ensayo se hizo mediante la implementación del control estadístico, por medio de un gráfico de control. El trabajo rutinario del ELISA se evaluó durante un año, con la cuantificación del control positivo del ensayo. Se efectuaron 200 ensayos, que están entre los límites de control establecidos con un CV entre todos los valores de 8.84% (Figura 5). De ellos, solo dos están por encima de 2 sigma, lo que representa el 1% de los ensayos. Estos resultados demuestran que el ELISA no pierde su estado de ‘control’ para los atributos críticos de calidad del ensayo, y que por tanto se asegura su calidad, de manera continuada.

**Discusión**

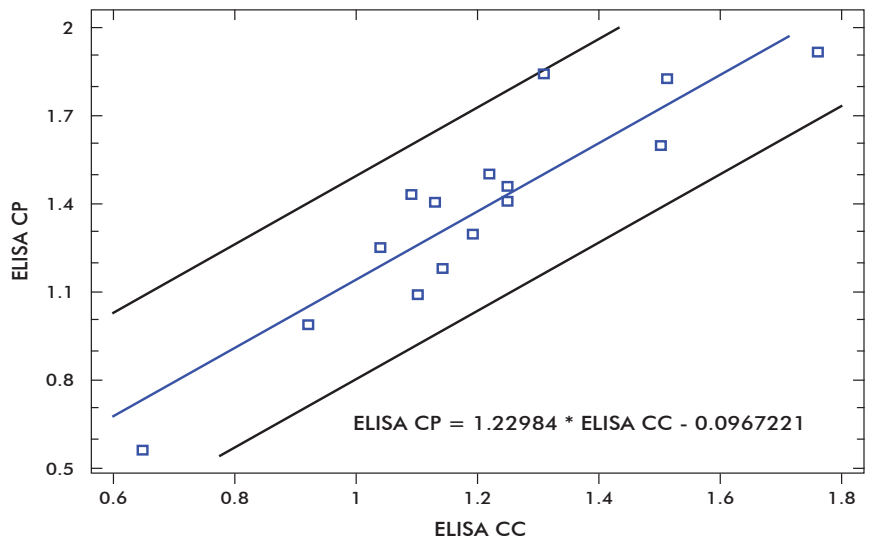
Se desarrolló y validó un nuevo ELISA sándwich para cuantificar el AgsHB en muestras del proceso de producción. A diferencia de otros ELISA reportados [20], este utilizó el único AcM para la cuantificación del AgsHB. La estandarización de este ELISA, por medio de técnicas como la metodología de superficie de respuesta, reveló que la mayor señal, derivada de la reacción antígeno-anticuerpo ocurre cuando se recubre la placa durante 20 min a 50 °C a una concentración de 10 µg/mL. Ello puede deberse a que la elevada temperatura favorece la interacción del AcM con la placa, y por tanto, los anticuerpos fijados a la placa pueden capturar un número mayor de moléculas de antígeno, como describen Leyva y cols. [21].

Las técnicas inmunoquímicas se caracterizan por la selección de una curva de calibración para la obtención de los resultados [22]. En este estudio, la curva de referencia se preparó a partir de diluciones seria-

**Tabla 3. Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia del ELISA**

Pasos del Proceso*	Parámetro Precisión (CV%)	Analista 1			Analista 2			Analista 4		
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
Rupt	Repetibilidad	3.48	3.38	1.52	0.81	2.37	0.84	0.17	7.43	1.46
	Intra-analista			9.15			13.47			9.37
	Interanalista									11.46
SH	Repetibilidad	3.52	1.07	1.48	3.68	0.39	0.28	2.61	4.10	6.32
	Intra-analista			9.15			7.77			6.96
	Interanalista									7.42
CCT	Repetibilidad	3.88	5.16	1.72	5.85	6.33	6.03	4.63	2.40	2.63
	Intra-analista			11.47			5.65			9.27
	Interanalista									10.79
ION	Repetibilidad	3.64	4.41	13.63	1.64	1.29	1.56	2.38	1.33	2.97
	Intra-analista			7.43			1.88			5.2
	Interanalista									8.17
EIAF	Repetibilidad	2.51	2.21	4.59	2.17	1.03	4.78	0.75	3.60	1.56
	Intra-analista			4.53			10.12			13.31
	Interanalista									10.40
IIP	Repetibilidad	4.91	1.51	1.18	4.52	2.09	0.42	2.86	8.95	4.80
	Intra-analista			8.19			3.28			11.74
	Interanalista									10.12
IFA	Repetibilidad	1.12	2.56	3.13	1.21	1.54	5.24	2.72	2.12	2.73
	Intra-analista			3.07			10.28			4.45
	Interanalista						13.97			

\*Rupt: sobrenadante de ruptura; SH: sobrenadante de la precipitación ácida; CCT: concentrado de celite filtrado; ION: fracción no retenida de intercambio iónico negativo ajustado; EIAF: eluato de inmunofinidad; IIP: eluato de intercambio iónico positivo 400 mM; IFA: ingrediente farmacéutico activo.



**Figura 3. Estudio de reproducibilidad por correlación, entre el ELISA del laboratorio de Control de Procesos (ELISA CP) y del laboratorio de Control de la Calidad (ELISA CC).**

das del patrón de AgsHB para cada ensayo. El ensayo mostró un rango lineal entre 191.7 y 11.9 ng/mL. Este resultado es similar a otros ELISA, como el descrito por Karakufi y cols. [23]. Un parámetro importante examinado en la validación de los ensayos analíticos fue la especificidad, especialmente de los inmunoensayos [22], que consiste en la posibilidad de medir el analito inequívocamente en presencia de otros componentes de la muestra [15, 16]. Los resul-

20. van Roosmalen MH, de Jong JJ, Haenen W, Jacobs T, Couwenberg F, Ahlers-de Boer GJCM, et al. A new HBsAg screening assay designed for sensitive detection of HBsAg subtypes and variants. *Intervirology*. 2006;49:127-32.

**Tabla 4. Reproducibilidad por ANOVA para demostrar la relación lineal entre los ELISA de Control de procesos y Control de la calidad.**

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
Regresión	1.46774	1	1.46774	24746.65	0
Residual	0.000474486	8	0.0000593107		
Total	1.46822	9			

tados de los ensayos de interferencia mostraron que el AcM CB.Hep-1 reconoce específicamente al AgsHB en presencia de los contaminantes de la muestra.

Para analizar la posibilidad del ensayo de cuantificar exactamente la concentración de AgsHB en cada una de las muestras del proceso de producción, se compararon las concentraciones obtenidas en el ELISA, con la concentración teórica. Las muestras se analizaron con tres niveles de comparación. En cada una, el recobrado varió entre 98.18 y 100.31%, con un promedio de 100%. Estos resultados sugieren que el ELISA con el AcM CB.Hep-1 se puede usar para la determinación del AgsHB en muestras biológicas.

La precisión se evaluó con la determinación del CV en dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia. En cada uno, fue inferior a 10 y 20%, respectivamente, lo cual concuerda con los criterios de aceptación descritos en la regulación No. 41 del 2007 del Cecmed y la IHC Q2 (R1) [15, 16]. Además, están por debajo de la propuesta de Findlay y cols. [22] para los ensayos inmunoenzimáticos, el cual propone un CV menor que 25% debido a que estos ensayos son menos precisos que los cromatográficos, por lo que requieren más experimentos para resultados más confiables. El estudio colaborativo entre los laboratorios demostró que el ensayo es reproducible, pues el coeficiente de correlación fue mayor que 0.90, en la determinación de las muestras analizadas. Este resultado concuerda con el de Wapenaar y cols. [24], quienes refieren una buena correlación en un ELISA de competencia, con un valor de  $r$  igual a 0.9.

Después de la validación de un método analítico, es importante monitorearlo constantemente, así como la aplicación para la cual fue diseñado. Las técnicas estadísticas para el control del proceso de las proteínas recombinantes y la interpretación de los resultados, son herramientas que facilitan la verificación continua [25]. El gráfico de control representa los resultados de un parámetro específico en el tiempo. Proporciona información valiosa sobre las tendencias, y demuestra el control, la consistencia y la fiabilidad de la prueba. Su utilización en el ELISA demostró la estabilidad y confianza de los resultados, y en el análisis del recobrado del proceso evidenció la consistencia del proceso de producción.

**Conclusiones**

Los resultados del estudio de validación del método de ELISA para la cuantificación del AgsHB en muestras del proceso de producción, indican que el ensayo es lineal en el rango de 191.7 a 11.9  $\mu\text{g/mL}$ , con un valor del coeficiente de regresión mayor que 0.98. Se demostró que el método es exacto, debido a que no hay diferencias significativas entre la concentración del antígeno determinado por la técnica, y la concentración esperada de las mezclas. Su precisión es aceptable, con valores inferiores al 10% en la repetibilidad, y al 20% en la precisión intermedia. Hay correlación entre los valores determinados en los laboratorios de CP y CC en el estudio de reproducibilidad. El método es adecuado, y proporciona datos confiables del comportamiento del proceso de obtención del AgsHB. Su comparación con los criterios de aceptación establecidos, evidencia que la validación de la técnica es satisfactoria y, por tanto, se puede utilizar en el control del proceso de producción del AgsHB.

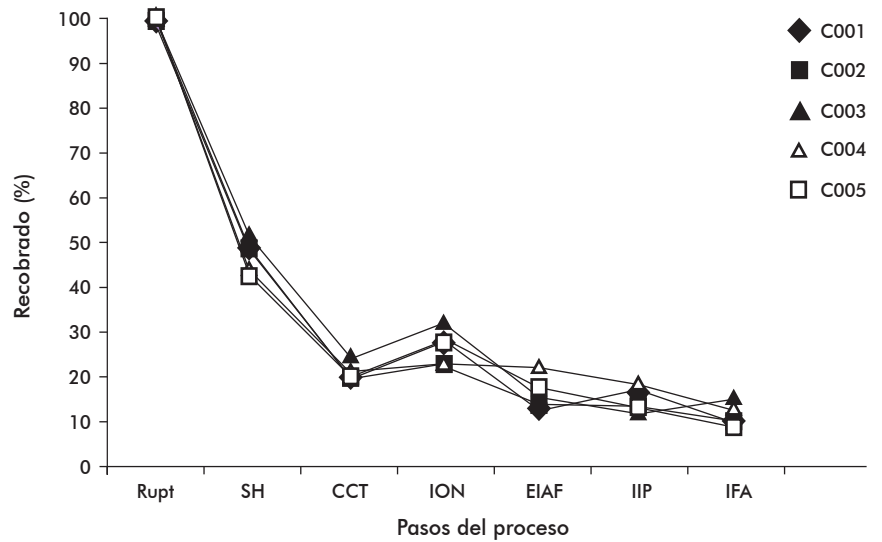


Figura 4. Recobrado de cada paso del proceso de producción del AgsHB. Análisis de cinco lotes de proceso. Rupt: sobrenadante de ruptura; SH: sobrenadante de la precipitación ácida; CCT: concentrado de celite filtrado; ION: fracción no retenida de intercambio iónico negativo ajustado; EIAF: eluato de inmunoadfinidad; IIP: eluato de intercambio iónico positivo 400 mM; IFA: ingrediente farmacéutico activo.

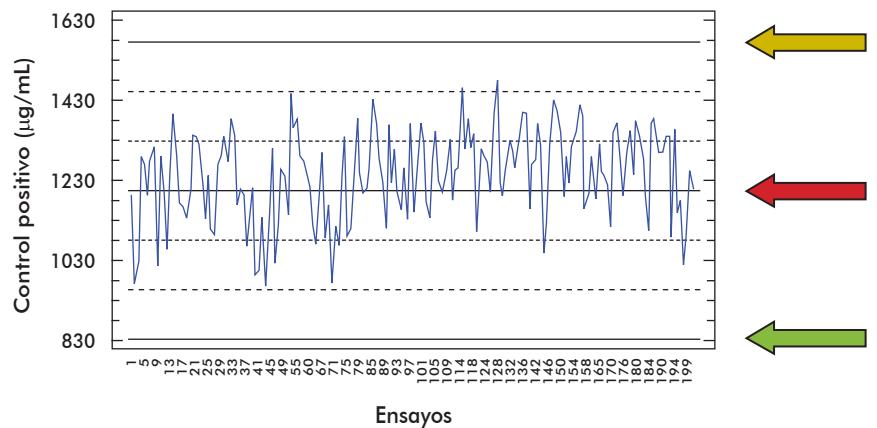


Figura 5. Control del ELISA. Representación de 200 ensayos en un año. Línea naranja: límite superior de control (1575.99); Línea roja: Valor central (1206.00); Línea verde: límite inferior de control (836.01).

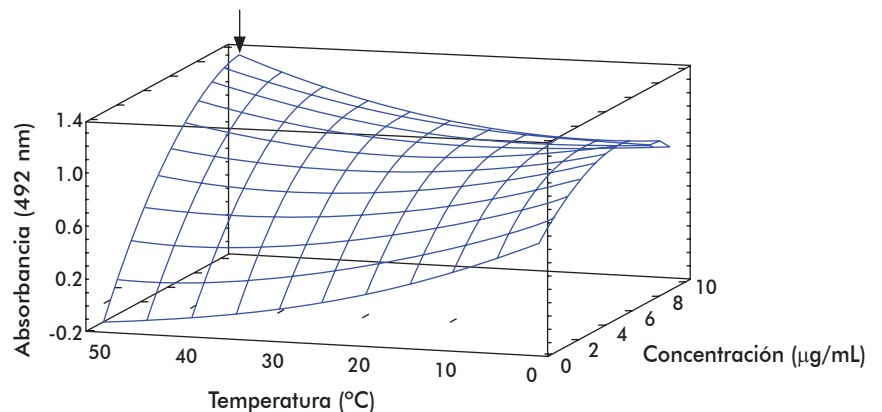


Figura 6. Metodología superficie respuesta para determinar las condiciones de trabajo del ELISA. La flecha indica la condición óptima (concentración de recubrimiento de 10  $\mu\text{g/mL}$ , incubado durante 20 minutos a 50  $^{\circ}\text{C}$ ).

21. Leyva A, Franco A, González T, Sánchez JC, López I, Geada D, *et al.* A rapid and sensitive ELISA to quantify an HBsAg specific monoclonal antibody and a plant-derived antibody during their downstream purification process. *Biologicals*. 2007;35(1):19-25.
22. Findlay JW, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, *et al.* Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal*. 2000;21(6):1249-73.
23. Karakuş R, Aral LA, Baştürk B, Aybay C. Development of a highly sensitive ELISA for quantification of hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg). *Turk J Med Sci*. 2007;37(2):87-92.
24. Wapenaar W, Barkema HW, Vanleeuwen JA, McClure JT, O'Handley RM, Kwok OC, *et al.* Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet Parasitol*. 2007;143(2):166-73.
25. Fuge J. FDA CONFERENCE Report: Validation Considerations When Preparing For FDA Inspections. *J Validat Technol*. 2005;11(3):253-6.

---

Recibido en diciembre de 2010. Aprobado en septiembre de 2011.