REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): VALIDACION PARA EL USO EN EL CONTROL DE CALIDAD DE HEMODERIVADOS.

Maida Candelario, Felipe Rolo*, Marcelo Nazábal, Raúl A. Poutou, Eladio Amador y Marisel Quintana.

*Subdirección de Calidad, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, C.P. 10600, Cuba. *Laboratorio de Referencia de SIDA, Apartado 23031,. La Habana 14, Cuba.*

Recibido en noviembre 1993. Aprobado en enero de 1994

Key words: polymerase chain reaction, HIV1, quality contol, primer

SUMMARY

The validation results of the polymerase chain reaction (PCR) used for HIV1 DNA detection, in blood-derived pharmaceutical products are presented. Repetibility and specificity were evaluated as well as the use of different DNA quantities of the positive control in order to know what DNA level could be detected and amplified by PCR. Liquid hybridization with HIV1 specific probes was used as detection method. It was concluded that PCR for HIV1 detection in blood derived products has a specificity about 100% and a sensivity of 100 pg of DNA, showing that PCR can be used as quality control method.

RESUMEN

Se presentan los resultados de la validación de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleada para la detección de ADN de HIV1 en muestras de productos farmacéuticos derivados de la sangre. Se evalúa la repetibilidad y especificidad del método, así como el empleo de diferentes cantidades de ADN (control positivo) con vistas a determinar qué nivel puede ser detectado y amplificado por la PCR. El método de detección del producto amplificado, fue la hibridación líquida, utilizando sondas específicas para el HIV1. La sonda empleada para la detección de HIV1 en este tipo de productos resultó tener 100% de especificidad, logrando detectar 100 pg de ADN, que fue el último punto ensayado, por lo que se concluyó que la PCR puede utilizarse como técnica de Control de Calidad de hemoderivados.

INTRODUCCION

La PCR es un proceso enzimático *in vitro* a través del cual un fragmento de ácido nucleico sirve como molde en la reacción, replicándose varias veces, para dar como resultado miles de copias de esa secuencia (1). Este método ha sido utilizado para el diagnóstico de enfermedades virales producidas por retrovirus, como el HIV1, HIV2, HTLV1 y otros, debido a su gran sensibilidad y especificidad (2).

Teniendo en cuenta que la sangre utilizada como materia prima en la producción de hemoderivados es liberada por técnicas que se basan en la detección de anticuerpos y que existen pacientes contaminados que no presentan anticuerpos (período de ventana), se recurrió a la PCR para la detección de trazas de ADN de HIV1 en este tipo de productos (2).

En la actualidad existen normas y regulaciones a nivel internacional que establecen y hacen referencia a la importancia de la validación de los métodos analíticos. Los formatos y guías para el diseño de las validaciones han sido reportados previamente (3-7).

Estos protocolos establecen categorías generales dentro de las cuales se ubican los métodos analíticos (3) y en dependencia de esta ubicación y del propósito de la técnica es que se seleccionan los parámetros a evaluar. Las categorías propuestas son: métodos cuantitativos para la determinación del compuesto activo (grupo A), métodos cuantitativos para determinar impurezas (grupo B), métodos de identificación (grupo C) y métodos para determinar el límite de impurezas (grupo D). La PCR para detectar ADN de HIV1 pertenece al grupo C, de ahí que el parámetro más importante a evaluar sea la especificidad.

En el presente trabajo se reporta el estudio de repetibilidad y especificidad de la PCR para la detección de HIV1 en hemoderivados, y se hace referencia a la sensibilidad obtenida por el método, o sea el límite de detección. De esta forma se logra garantizar la seguridad y calidad de los productos derivados de la sangre, que son evaluados por éste método.

MATERIALES Y METODOS

A) Condiciones de reacción

La reacción se realizó en solución tampón de Saiki sin gelatina (0.5 M de KCl, 0.1 M de Tris-HCl pH 8.4 y 0.025 M de $MgCl_2$). Se emplearon 100 μM de dNTPs (Boehringer), 2 unidades de Taq pol (Heber Biotec) y 20 pM de oligonucleótidos cebadores

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

Procedimiento para la determinación de la actividad de unión a receptores específicos de membrana por radioreceptor (RRA)

Este ensayo se utilizó para determinar de forma indirecta y cuantitativa la actividad biológica del FCE h-rec a través de un ensayo de unión a receptores basado en una reacción de competencia, que se establece entre la proteína marcada con radioisótopo I^{125} y la proteína no marcada, por los sitios receptores de membrana situados en la superficie de las células A431 de carcinoma epidermoide de vulva (Macías et al., 1985).

Para el ensayo de competencia (efectuado en duplicado) se añadieron en tubos de poliestireno LP-3 en concentraciones crecientes, 50 μL del FCE h-rec no marcado patrón (0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL). En otra serie de tubos fueron adicionados 50 μL por duplicado de las diluciones de las muestras a evaluar, seguidamente se añadieron a todos los tubos de reacción del ensayo 330 μL del tampón de ensayo (tampón fosfato-salino y BSA al 0.1%), 20 μL del I^{125} FCE h-rec y 100 μL de la suspensión celular (células A431) para un volumen final de 500 μL. Se prepararon controles internos del ensayo para medir la radiactividad total, unión total y unión no específica. Se incubaron todos los tubos 45 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción y se añadió 1 mL del tampón de ensayo frío a cada uno de los tubos. Se centrifugaron los tubos a 45 000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se midió la actividad de unión a receptores en un contador Clinigamma (LKB, Suecia) (Rojo et al., 1990) Se calcularon la pendiente y el intercepto, los que se utilizaron para el cálculo de la concentración de las muestras evaluadas. Para demostrar la correlación de ambos métodos (RRA y ELISA) se evaluaron simultáneamente muestras representativas del proceso de producción.

Determinación de la concentración de proteínas por lectura de la absorbancia a 280 nm

Los valores de unidades de absorbancia obtenidos en el ensayo por cada dilución se dividieron por el coeficiente de extinción porcentual del FCE h-rec, que es 3.1, y posteriormente se multiplicó por el factor de dilución obtieniéndose el valor de concentración en mg/mL.

Control de la pureza del FCE h-rec (RP-HPLC)

Se utilizó una columna Octyl C8 WP (J. T Baker) de 4.6 mm de diámetro interno y 100 mm de largo con un tamaño de partícula de 5 μm, se mantuvo la temperatura en 50°C y el flujo se fijó en 2 mL/min. Para la elución se utilizó solución A (0.01% de ácido trifluoracético (TFA) en agua) y solución B (0.05% de TFA en acetonitrilo). Se utilizó un gradiente de 20 hasta 40% de B durante 14 minutos, la longitud de onda de trabajo fue 226 nm según Moya et al. (1992).

Control de la pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

En este método se utilizó una modificación del sistema de Laemmli (1970) propuesta por Schager y Von Jacow (1987) que consistió en un gel separador de 16.5% de T (porciento total de monómeros) y 3% de C (porciento de concentración de entrecruzamiento relacionado con T). Para el tratamiento de las muestras se empleó un tampón que contenía SDS al 4% (calidad para electroforesis, BDH) glicerol al 12%, tris 50 mM, DTT (3 moles por mol de cisteína) y azul de coomassie G-250 al 0.01%, pH 6.8; con un tiempo de ebullición de 10 minutos y un ajuste de voltaje para la corrida de 90 v, luego se mantuvo el gel 30 minutos en solución fijadora (50% de metanol y ácido acético al 10%; se tiñó durante 2 h con azul de coomassie G-250. Se destiñó el gel con ácido acético al 10%.

Prueba de esterilidad de la materia prima activa del FCE h-rec

Se inoculó la muestra en medios de cultivo de caldo tioglicolato y triptona-soya y se incubó a 35°C y 22°C respectivamente, durante 14 días según United States Pharmacopeia (USP XXII).

Ensayo de Inmuno dot para la cuantificación de contaminantes de la cepa hospedera

Se preparó una curva patrón de proteínas de la cepa hospedera (5, 2.5, 1.5, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 y 0.039 μg) y las diluciones de las muestras de FCE h-rec. Estas se aplicaron en un filtro de nitrocelulosa y se colocaron en el equipo de Hibridot. Este filtro se puso en contacto con la solución de bloqueo (tampón Tris-salino (TBS) - leche deslipidizada al 5%) durante 90 minutos a 42°C, con agitación lenta. Para el reconocimiento inmunológico se colocó el filtro en la solución de bloqueo con el anticuerpo específico durante un período de incubación de 90 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados con TBS, de 5 minutos cada uno, con agitación lenta, y un lavado intermedio de 10 minutos con TBS y NP 40 al 0.1%. Por último se aplicó el revelador del ensayo (proteína A conjugada con oro coloidal) hasta obtener las manchas en la membrana de nitrocelulosa. La cantidad de proteínas contaminantes presentes en la muestra se determinó por comparación visual entre la señal obtenida y la señal de los puntos de la curva patrón.

RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo con los requerimientos necesarios para las formulaciones farmaceúticas que contienen FCE h-rec como principio activo, se establecieron las especificaciones de calidad para esta sustancia en el momento de liberación como materia prima activa. En la tabla 1 aparecen los límites de aceptacion para cada técnica según OMS (1992).

Ensayo inmunoenzimático

Por la importancia del producto desde el punto de vista clínico se hace necesaria una técnica analítica confiable que constituya un importante criterio de potencia en la evaluación y liberación del FCE h-rec, como materia prima activa y como producto terminado. En la figura 1 se muestra una curva de calibración típica del método. A partir de los valores de concentración de la muestra control en 26 ensayos se estimaron parámetros de validación como la precisión y la linealidad. Para la precisión se halló que el coeficiente de variación intra e interensayo fue 7.91 y 9.9% respectivamente; la linealidad fue evaluada a través del valor de potencia de correlación (r^2) obtenido en el procesamiento de los datos de las curvas de calibración de estos ensayos y del valor del coeficiente de correlación del ensayo de

Tabla 1
Especificaciones de calidad del principio activo (FCE h-rec)

Pruebas	Requerimientos
Ensayo de unión a receptores	Límite de aceptación: 0.25 mg/mL
Inmunoidentificación	Método de ELISA límite de aceptación: 0.25 mg/mL
Análisis de absorbancia a 280 nm	Límite de aceptación: 0.25 mg/mL
Cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC)	Dos especies mayoritarias de FCE h-rec correspondiente al FCE 52 y 51 aminoácidos
Determinación de la pureza por Inmuno-dot (ng de proteínas contaminantes de levadura/ μg de FCE h-rec)	Limite de aceptación: ≤50 ng/μg de FCE h-rec
Determinación de pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	Pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) límite de aceptación: ≥95% banda mayoritaria de 6000 Da
Esterilidad	Pasa la prueba
pH	* 6.0 - 7.0
Condiciones de almacenamiento: 2 - 8°C	

recobrado. En el estudio de recobrado se obtuvo un 111.86% de recuperación promedio que se corresponde con la exactitud del método. Para su liberación los lotes de materia prima activa deben tener una concentración superior a 0.25 mg/mL (tabla 2) debido a consideraciones del proceso tecnológico en la producción de la forma terminada HEBERMIN según registro sanitario.

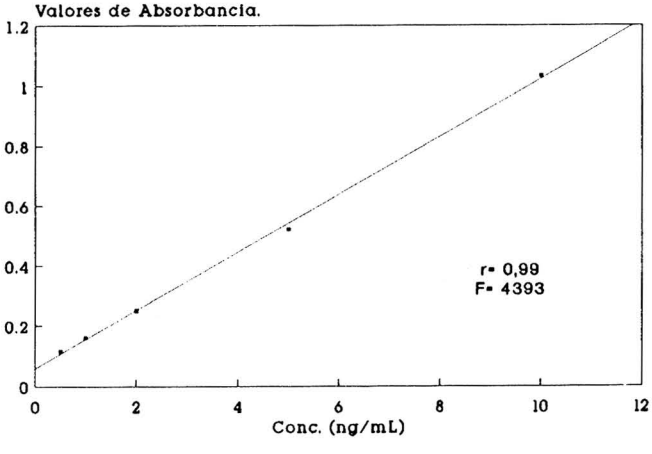

Fig. 1 Curva de calibración del método ELISA

Tabla 2
Resultados de lotes de materia prima activa liberados por ELISA para la producción de HEBERMIN

Lote	Conc.(mg/mL) ELISA	Lote	ELISA conc.(mg/mL)
E0292	0.272	E0592	0.500
E0392	0.406	E0692	0.312
E0492	0.450	E0792	0.579

Ensayos de determinación de la actividad de unión a receptores de membrana (RRA)

Dentro del control de calidad que se realiza al producto, que comprende varias técnicas de análisis, solamente el ensayo de unión a receptores ofrece la ventaja de medir una propiedad directamente relacionada con la actividad biológica del FCE h-rec, por lo que su medición constituye un criterio de potencia de importancia en la liberación de los lotes finales de materia prima activa para la producción de la crema HEBERMIN. En la figura 2 se muestra una curva típica de un ensayo de radioreceptor. Los resultados obtenidos en este ensayo de la curva patrón no cumplen un comportamiento lineal; por ello se hace una transformación **Logit** de los datos y se plotea el **Logit Y** contra el logaritmo de la concentración, donde **Y** es el porciento de unión.

$$\text{Logit } Y = \ln \frac{Y}{100-Y}$$

El valor de concentración por este método coincidió con el valor de concentración obtenido por el método de ELISA (tabla 3) indicando que el FCE h-rec como principio activo es biológicamente activo y puede ser incorporado a la forma terminada.

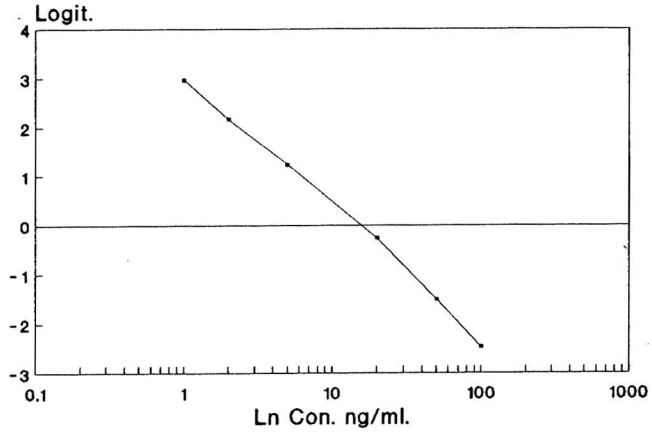

Fig. 2 Transformación Logit de los datos de la curva patrón del RRA.

Tabla 3
Comparación de los valores de concentración de FCE h-rec por RRA y ELISA en lotes finales de materia prima activa

Lote	RRA (conc. mg/mL)	E L I S A (conc. mg/mL)
E0191	0.290	0.320
E0391	0.480	0.484
E0491	0.389	0.385
E0591	0.431	0.400

Determinación de la concentración de proteínas por lectura de la absorbancia a 280 nm.

Mediante los resultados obtenidos por esta técnica en lotes finales de materia prima activa de FCE h-rec para la producción de la crema HEBERMIN, se tiene un criterio más exacto del valor de potencia que se le adjudica al lote, debido a que el coeficiente de variación entre este método y el ELISA es $\leq 10\%$ (tabla 4).

Ensayo de Cromatografía (RP-HPLC)

Esta técnica constituye un criterio de pureza debido a que es capaz de resolver diferentes especies moleculares del FCE h-rec.

Un cromatograma típico se muestra en la figura 3, donde se observan 2 especies mayoritarias correpondientes al FCE h-rec de 51 aminoácidos en su estrucura primaria (pico 2) y FCE h-rec de 52 aminoácidos (pico 4). Además aparecen dos especies minoritarias que se corresponden al FCE h-rec de 51 aminoácidos oxidado (pico 1) y FCE h-rec de 52 aminoácidos oxidado (pico 3) según Besada *et al.* (1990).

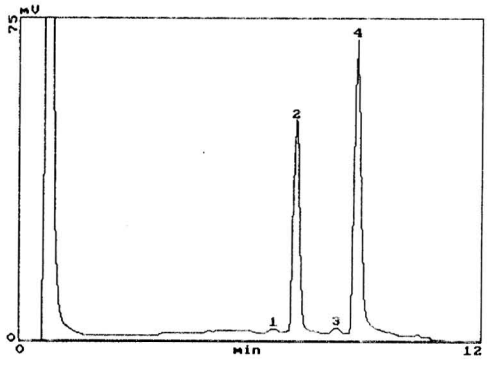

Fig. 3. Perfil cromatográfico de la proteína. Los picos 2 y 4 corresponden al FCE h-rec de 51 aminoácidos y el FCE h-rec de 52 aminoácidos respectivamente. El pico 1 corresponde al FCE h-rec de 51 aminoácidos con la metionina oxidada y el pico 3 al FCE h-rec de 52 aminoácidos con la metionina oxidada

Tabla 4
Comparación de los valores de concentración de proteína obtenidos por análisis de absorbancia a 280 nm y ELISA para la determinación de FCE h-rec y valor del coeficiente de variación (CV %) inter-técnica por lote final.

Lotes	Técnicas analíticas		CV (%)
	Análisis de Absorbancia a 280 nm (mg/mL) FCE h-rec	ELISA (mg/mL) FCE h-rec	
E0292	0.286	0.272	3.54
E0392	0.383	0.406	4.12
E0492	0.470	0.450	3.07
E0592	0.473	0.500	3.92
E0692	0.272	0.312	9.68
E0792	0.627	0.579	5.62

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Este método resulta de gran importancia como criterio de pureza en las preparaciones finales que contienen el principio activo antes de ser formulado, observandose una única banda a nivel de 6000 Da que es

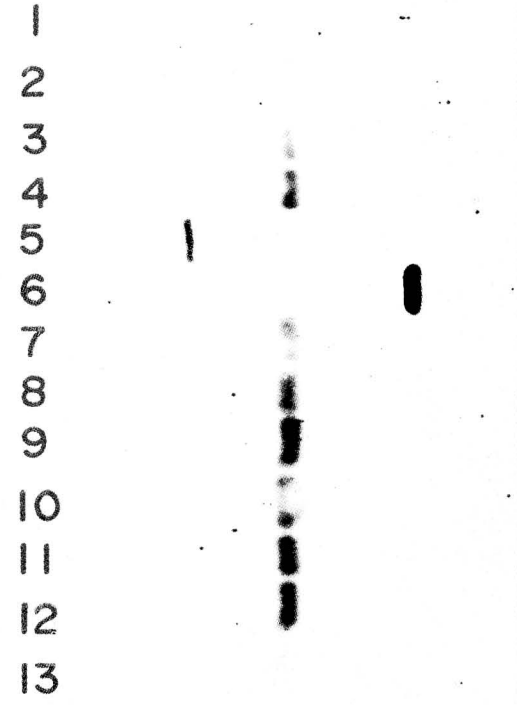

Fig. 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) del FCE h-rec. Las bandas 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12 y 13 corresponden al producto final de diferentes lotes de producción de la proteína. Las bandas 5 y 6 corresponden a marcadores de peso molecular y la banda 9 se corresponde con el patrón de FCE h-rec.

comparada a su vez con dos patrones de peso molecular que son cadenas A y B de Insulina (3000 Da) y el citocromo C (12 000 Da). Para el control electroforético se aplica en cada ensayo una muestra patrón de FCE h-rec (figura 4)

Prueba de esterilidad del FCE h-rec

Esta prueba resultó de gran importancia en el testaje del producto, porque pudo darse una alta probilidad de seguridad de la no existencia de microorganismos contaminantes dentro del lote. Transcurridos los 14 días de inoculación se revisaron los medios donde fue sembrada la muestra observandose ausencia total de turbidez en el medio.

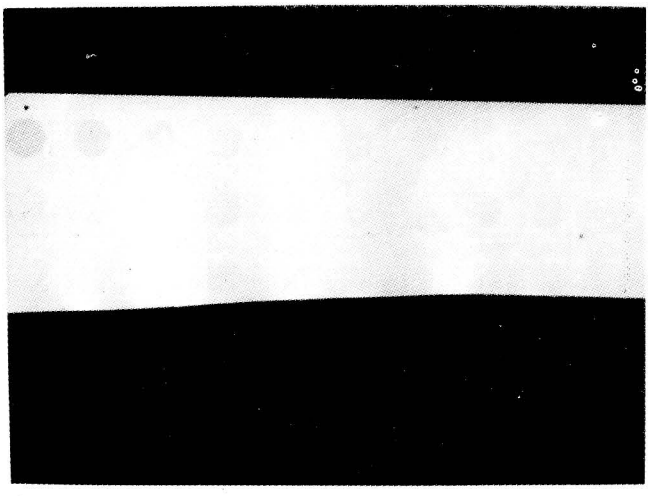

Fig. 5. Inmuno dot. Curva patrón de proteínas (10, 5, 2.5, 1.5, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 y 0.039 μg) de la cepa hospedera.

En correspondencia con los resultados que se obtengan se puede evaluar la ausencia de microorganismos viables y saber si el producto es esteril, según USP XXII.

Inmuno dot antiproteínas contaminantes de la cepa hospedera.

Este ensayo se utilizó como criterio de pureza para la determinación de proteínas contaminantes de la cepa hospedera en lotes finales de materia prima activa utilizada en formulaciones farmacéuticas. La concentración de proteínas contaminantes no debe ser mayor o igual a 50 ng/μg de FCE h-rec (figura 5).

CONCLUSIONES

Se describió una metodología para el control analítico del FCE h-rec como materia prima activa en formulaciones farmaceúticas, integrado por un conjunto de técnicas de análisis precisas, reproducibles y de fácil ejecución que permiten garantizar la calidad del producto para su aplicación clínica.

Se establecieron las especificaciones de calidad del FCE h-rec acorde con las normas y reglamentaciones internacionales para este tipo de sustancia que garantizan la liberación y posterior comercialización de nuestro producto como principio activo o producto terminado.

REFERENCIAS

BESADA, V.; W. ANTUCH; A.M. CINZA; I. ROJAS; M. QUINTANA y G. PADRÓN (1990). Chemical characterization of recombinant epidermal growth factor. Anal. Chim. Acta **239**:301-305.

COHEN, S.(1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new - born animal. J. Biol. Chem. 237:1555-1562.

CINZA, A.M.; M. QUINTANA; J. LOMBARDERO; R. POUTOU; E. PÉREZ; L.C. PEREZ; C. MELLA; V. BESADA; G. PADRON; L. CASTELLANOS y J. GRILLO (1989). Establecimiento de un cultivo discontínuo para la producción del Factor de Crecimiento Epidérmico humano en levaduras. Caracterización del producto. Biotecnología Aplicada **8(2)**:166-173.

FREYRE, M.; J. VAZQUEZ; C. DUARTE; E. FERRA; I. LOPEZ; N. ARTEAGA; A. ALFARO y J. GAVILONDO (1988). Anticuerpos Monoclonales que reconocen los factores de crecimiento epidérmico humano y murino. Interferón y Biotecnología. **6(1)**:32-43.

LAEMMLI, U.K (1970). Clonage of structural proteins during of Iodine - 131 label Human Growth Hormon of high specific activity. Nature **194**:495-496.

MACIAS, A., R. PEREZ y A. LAGE (1985). Estudios sobre el Factor de Crecimiento Epidérmico II. Desarrollo de un radioreceptor análisis para la determinación de cantidades picomolares. Interferón y Biotecnología. 2(2):115-127.

MOYA, G.; L. COSTA y E. GONZALEZ (1992). Estudio estedístico de un método cromatográfico para el control de calidad del FCE h - rec. Libro de reportes cortos del Congreso Biotecnología Habana 92 Cuba.

PEREZ, E.; L.C. PEREZ; E. BOVER; I. WONG; A.M. CINZA; A. MACIAS y C. MELLA (1990). Control del proceso de purificación del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante mediante diferentes métodos analíticos. Biotecnología Aplicada. **7(2)**:188-196.

ROJO, D.M.; L.C. PÉREZ y P. RODRÍGUEZ (1990). Desarrollo de un análisis de radioreceptores para la determinación de cantidades picomolares de EGF empleando células A431. Libro de reportes cortos del II Congreso Latinoamericano de Biotecnología. Agosto de 1990, Cuba.

SCHAGGER, H. y G. VON JACOW. (1987) Tricina - Sodium Dodecil Sulphate - Polyacrilamida Gel electroforesis for the separation of proteins in the range from 1 ta 100 kDa. Anal. Biochem **166**:368-378

United States Pharmacopeia XXII, Nathional Formulary, United States **19**:1711-1712.

OMS, Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. (1992). WHO Technical Report Series, **823**:1-128.