

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CONTENIDO ANTIGÉNICO EN VACUNAS CONTRA LA HEPATITIS B MEDIANTE EL ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA)

Standardization of identification and determination of antigenic content in hepatitis B vaccines *enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) method*

Gisela Severino, Hernán Julin, Paola Cassano, Patricia Aprea.

Laboratorio de Inmunobiológicos; Dirección de Evaluación y Control de Biológicos y Radiofármacos;

Instituto Nacional de Medicamentos; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.

Contacto: gseverino@anmat.gov.ar

Recibido: 12 de junio de 2019. Aprobado: 10 de abril de 2020.

RESUMEN

Las afecciones causadas por el Virus de la Hepatitis B (VHB) constituyen una de las grandes problemáticas de salud pública a nivel mundial. En la actualidad la principal estrategia de prevención es una vacuna obtenida mediante la tecnología de ADN recombinante a partir de la expresión del gen viral que codifica el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). En Argentina, esta vacuna está incorporada en el Calendario Nacional de Vacunación desde el año 2000, y es deber de la Autoridad Reguladora Nacional (ARN) verificar la calidad, seguridad y eficacia de cada lote liberado al mercado. Considerando que la determinación del contenido antigénico en vacunas representa uno de los ensayos esenciales de control de calidad y que, para ello, es necesario contar con metodologías estandarizadas que permitan obtener resultados reproducibles y confiables, en el Laboratorio de Inmunobiológicos del Instituto Nacional de Medicamentos se estandarizó un método para la identificación y cuantificación del HBsAg en vacunas contra la Hepatitis B empleando un kit comercial de ELISA cuyo uso clínico está previsto para la detección de HBsAg en suero o plasma humano. Para ello, se analizaron dos muestras: una preparación de antígeno HBsAg purificado y una vacuna contra la Hepatitis B ADN recombinante comercial y se evaluaron los parámetros de especificidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia y linealidad. En todos los casos, se cumplieron con los criterios de aceptación establecidos para cada parámetro, por lo cual se concluye que la metodología analítica es adecuada para la identificación y cuantificación del HBsAg.

Palabras clave: vacuna ADN recombinante, Hepatitis B, HBsAg, ensayo *in vitro*, cuantificación.

ABSTRACT

The infection caused by the hepatitis B virus (HBV) is one of the major public health problems worldwide. Currently the main prevention strategy is the HBV vaccine obtained by recombinant DNA technology from the expression of the viral gene encoding the hepatitis B surface antigen (HBsAg). In Argentina, the hepatitis B vaccine has been incorporated into the National Vaccination Schedule since 2000, and it is the duty of the National Regulatory Authority (NRA) to verify the quality, safety and efficacy of each batch of vaccine launched onto the market. Considering that the determination of the antigenic content in vaccines represents one of the essential quality control tests, and, to that end, it is necessary to have standardized methodologies that allow obtaining reproducible and reliable results, the Immunobiology Laboratory of the National Institute of Drugs has standardized a method for the identification and quantification of HBsAg in Hepatitis B vaccines using a commercial ELISA kit intended for clinical use to detect HBsAg in human serum or plasma. For this, two samples were analyzed: a preparation of purified HBsAg antigen and a commercial recombinant DNA Hepatitis B vaccine. The parameters: specificity, accuracy, repeatability, intermediate precision and linearity were evaluated. In all cases, the acceptance criteria established for each parameter were met, therefore, the analytical methodology proved to be appropriate for the identification and quantification of HBsAg, considering reliable and reproducible results.

Keywords: Recombinant DNA Hepatitis B vaccine, HBsAg, in vitro assay, quantification.

INTRODUCCIÓN

El Virus de la Hepatitis B (VHB) pertenece a la familia *Hepadnaviridae*, un grupo de virus que atacan a mamíferos (primates y roedores) y aves^[1]. El virión, también llamado partícula de Dane, es de forma esférica y tiene un diámetro de 42 nm, posee una nucleocápside icosaédrica compuesta por dímeros del antígeno del core de la Hepatitis B (HBcAg) dentro de la cual se encuentra el ácido desoxirribonucleico (ADN) circular de doble cadena^[2]. La nucleocápside, a su vez, está envuelta por una bicapa lipídica embebida por tres proteínas: una de bajo peso molecular, denominada pequeña (S) o mayor por ser la más abundante, otra de peso molecular intermedio denominada mediana (M) y una última, de mayor peso molecular o grande (L). Este complejo proteico se conoce como antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg)^[3] y es de gran importancia ya que se utiliza tanto como marcador serológico para el diagnóstico de la infección por VHB^[4], como también para la producción de vacunas^[5,6].

Actualmente, el VHB infecta a más de 250 millones de personas en el mundo^[7], siendo las afecciones más frecuentes la hepatopatía crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular, a causa de las cuales fallecen cerca de un millón de personas por año^[8,9]. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las hepatitis virales constituyen una de las grandes problemáticas de salud pública a nivel mundial^[7], sin embargo, la realidad de cada país es diferente. En la Argentina los datos de prevalencia del VHB demuestran que existe una endemidad baja en relación con otros países latinoamericanos^[10,11]. Frente a este escenario, la principal estrategia para la prevención de esta enfermedad adoptada desde hace varios años a nivel mundial es la vacuna contra el VHB^[12,13].

Las primeras vacunas disponibles eran producidas mediante la extracción del HBsAg de plasma de los enfermos crónicos portadores del virus^[14]. En la actualidad, son obtenidas mediante la tecnología de ADN recombinante a partir de la expresión del gen viral que codifica el HBsAg en células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) o en células de mamíferos (células de ovario de hámster chino “CHO” u otras líneas celulares adecuadas); una vez inducida su expresión se purifica el producto para obtener la preparación inmunogénica. A su vez, el antígeno puede ser adsorbido sobre un soporte mineral como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio hidratado que funciona como adyuvante para una mayor efectividad en la respuesta inmune^[15,16].

En nuestro país, la vacuna contra la Hepatitis B está incorporada en el Calendario Nacional de Vacunación desde el año 2000, indicada para recién nacidos, y en el año 2003 se extendió a niños de 11 años para iniciar o completar el esquema. Además su aplicación es obligatoria para el personal de la salud y está recomendada para grupos de riesgos^[17]. En el año 2012, se propuso la estrategia de vacunación universal para toda la población no vacunada con el objetivo de aumentar la cobertura y avanzar en el proceso de control y erradicación de la enfermedad^[18].

En términos regulatorios, la OMS establece que cada lote de vacuna que será liberado al mercado debe ser evaluado de forma exhaustiva por la Autoridad Reguladora Nacional (ARN). La naturaleza biológica de la materia prima y los métodos de producción y control, hace que cada partida de producción sea considerada única y, por lo tanto, estos productos están sujetos a una verificación rigurosa lote por lote^[19]. En nuestro país, el ente regulador es la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). El proceso de liberación de lote involucra una evaluación documental y, en algunos casos, la realización de ensayos sobre el producto terminado, por parte del Laboratorio Nacional de Control (LNC). En el Laboratorio de Inmunobiológicos perteneciente a la Dirección de Evaluación y Control de Biológicos y Radiofármacos se llevan a cabo los ensayos de control para verificar la calidad de las vacunas que se liberan al mercado. Recientemente, en la Dirección se realizó una revisión con el objetivo de relevar los métodos de análisis disponibles para la determinación de potencia en las vacunas contra hepatitis B comercializadas en la Argentina^[20]. Entre los principales aspectos que se discutieron, se destaca la dificultad de establecer un método único para la determinación de potencia que aplique a todos los productos del mercado; esto se debe a que cada elaborador utiliza distintos procesos de fabricación y diferentes adyuvantes para la formulación de las vacunas, por lo cual resulta poco factible establecer un Estándar Internacional de Referencia para la Vacuna de Hepatitis B^[21,22]. Por esto, según los lineamientos técnicos de OMS, cada elaborador debe establecer una preparación de referencia específica para su producto^[23]. A su vez, uno de los requerimientos regulatorios esenciales es el ensayo de valoración mediante el cual se compara la capacidad de la vacuna de producir anticuerpos específicos contra el HBsAg frente a una vacuna de referencia. De acuerdo a la monografía “Vacuna contra la Hepatitis B, ADN recombinante” de la Farmacopea Europea^[24], el ensayo puede ser realizado *in vivo*, en ratones o cobayos, o *in vitro* mediante la determinación inmunoquímica del contenido de antígeno, entre ellos, uno de los métodos más utilizados es el *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA)^[25]. Esta última alternativa, presenta la ventaja de ser un ensayo rápido y evita el uso de animales, en concordancia con la creciente tendencia para reemplazar los ensayos *in vivo* por métodos alternativos^[26].

El objetivo de este trabajo fue estandarizar un método para la detección y cuantificación del HBsAg en vacunas contra la Hepatitis B utilizando un kit comercial de ELISA apto para uso clínico en el diagnóstico de la enfermedad mediante la detección cualitativa de HBsAg en muestras de suero o plasma de pacientes. En este trabajo, la finalidad de uso del kit fue diferente a la prevista por el fabricante por lo que se debieron adecuar las condiciones de ensayo y estandarizar el método para una cuantificación en muestras de vacunas.

De acuerdo con los lineamientos de la *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), para estandarizar una metodología que

involucra una medición cuantitativa del componente principal, se deben evaluar los parámetros de exactitud, especificidad, precisión, linealidad y rango^[27]. Siguiendo estos lineamientos, en el Laboratorio de Inmunobiológicos se llevó a cabo la evaluación de los parámetros necesarios para estandarizar la metodología de identificación y determinación del contenido de HBsAg en vacunas recombinantes de Hepatitis B.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento: El contenido de HBsAg en las muestras se determinó utilizando el kit comercial Bioelisa®HBsAg 3.0 provisto de una placa de 96 pocillos, recubierta con un anticuerpo de cobayo anti-HBsAg. En cada determinación se sembraron 100 µl por triplicado de muestra, estándar y control negativo, y una única siembra para el control positivo. Se dejaron de 1 a 3 pocillos sin sembrar como blanco de sustrato. La placa se incubó durante 60 ± 5 minutos a 37°C y se realizó el procedimiento de lavado automático (3 ciclos de aspiración-lavado con 350 µl de solución de lavado durante 15 segundos). A cada pocillo, con excepción de los blancos, se le adicionaron 100 µl de anticuerpo de cabra anti-HBsAg conjugado con la enzima peroxidasa. La placa se incubó por 30 ± 2 minutos a 37°C, tras lo cual se repitió el procedimiento de lavado automático. En todos los pocillos se añadieron 100 µl de sustrato cromogénico (3,3', 5,5' Tetramelbenzidina). A continuación, la placa se incubó en oscuridad durante 30 ± 2 minutos a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1N. Inmediatamente después, en una lectora de microplacas se midió la densidad óptica (DO) a una longitud de onda $\lambda=450\text{nm}$ con filtro de referencia de 630nm. Todos los valores de DO fueron corregidos por el valor del blanco de sustrato.

Muestras: Muestra 1: Granel de HBsAg (antígeno purificado), Estándar 1: material de referencia *in house* para granel de HBsAg, Muestra 2: vacuna comercial conteniendo 20 µg/ml de HBsAg, Estándar 2: Hepatitis B Vaccine (rDNA) BRP, Batch 2. Vacuna hexavalente compuesta por toxoide diftérico, toxoide tetánico, antígenos de *Bordetella pertussis*, poliovirus inactivado (Tipo I, II y III), HBsAg y polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b.

Controles negativos: Suero humano negativo para HBsAg en *buffer* fosfato-azida sódica al 0,02% (control interno, incluido en el kit); los controles externos fueron la vacuna contra el virus de la influenza (Vacuna A) y vacuna antitetánica (Vacuna B).

Parámetros evaluados

Exactitud: Para determinar el grado de concordancia entre el valor del contenido de HBsAg estimado por el método y el valor teórico o declarado por los elaboradores, se realizaron tres ensayos independientes de determinación de contenido antigénico para cada muestra y se calculó la relación porcentual entre el valor estimado y el valor teórico. Criterio de aceptación: el valor estimado debe estar comprendido entre el 90-110 % del valor teórico o declarado.

Especificidad: Se comprobó la capacidad del método de identificar al HBsAg en presencia de otros antígenos y componentes que se prevé estén presentes en las muestras, para tal fin se utilizó la vacuna hexavalente. Se realizaron varias diluciones de la misma y se calculó la relación DO/valor umbral para la dilución de 1/32000 equivalente a una concentración de 0,625 ng/ml. El valor umbral representa la mínima señal inespecífica que puede ser detectada debido a diversos componentes presentes en la matriz de una muestra en ausencia del antígeno HBsAg, según las recomendaciones del fabricante se calcula de la siguiente manera: $\text{valor umbral} = \text{CNx} + 0,040$, siendo CNx el valor medio entre las tres réplicas obtenidos para el control negativo en un ensayo determinado. Criterio de aceptación: la relación $\text{DO}_{0,625} / \text{valor umbral} \geq 1$.

Adicionalmente, se evaluaron dos vacunas (Vacuna A y Vacuna B) cuya formulación no contiene HBsAg. Para cada una de estas vacunas se realizaron tres diluciones por triplicado. Los valores de DO obtenidos para el control negativo y para las distintas diluciones de las vacunas A y B fueron comparados mediante un análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés, *Analysis Of Variance*) de un solo factor para muestras independientes utilizando el programa de cálculo "*Social Science Statistics*". Criterio de aceptación: no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento, para un *p-valor* < 0,05.

Precisión: Para corroborar el grado de concordancia intra-ensayos (repetibilidad) se realizaron tres ensayos independientes para cada muestra, ejecutados por un mismo analista en distintos días (periodo corto). Por cada ensayo, se evaluaron 3 concentraciones (por triplicado) para cada muestra: 2,4- 1,2 y 0,6 ng/ml para la Muestra 1 y 1,62-1,08 y 0,72 ng/ml para la Muestra 2. Asimismo, para el análisis de la variabilidad entre ensayos, se evaluaron tres diluciones 2,4- 1,2 y 0,6 ng/ml del Estándar 1 en dos ensayos independientes realizados por dos analistas distintos en diferentes días (precisión intermedia). Para cada caso, se calculó el coeficiente de variación porcentual (CV%). Criterio de aceptación: el CV% entre las tres determinaciones debe ser $\leq 10\%$

Linealidad y rango: Se evaluó la relación lineal entre los valores de DO y la concentración de HBsAg en un intervalo definido. Inicialmente, se probaron distintos rangos de concentración de acuerdo con información disponible en bibliografía y en las técnicas analíticas de los elaboradores. Finalmente, las diluciones de trabajo propuestas para la Muestra 1 fueron 9,6- 4,8- 2,4- 1,2- 0,6- 0,3 y 0,15ng/ml, mientras que para la Muestra 2 se utilizó un rango de concentraciones de 1,62- 1,08- 0,72- 0,48- 0,32- 0,22ng/ml. Se realizaron tres ensayos independientes para cada una de las muestras y se determinó el coeficiente de correlación (R^2) de la curva dosis-respuesta. Criterio de aceptación: $R^2 \geq 0,990$.

El contenido de HBsAg se estimó utilizando el programa estadístico *Combistats* versión 3.0., según el modelo de líneas paralelas. En todos los casos, los ensayos debían cumplir con los parámetros de validez especificados por el fabricante del kit y los criterios de aceptación establecidos para cada parámetro evaluado. En los casos necesarios, se realizó el tratamiento de datos anómalos mediante la prueba de Dixon.

RESULTADOS

Exactitud: En la **Tabla 1** se muestra la concentración de HBsAg estimada para cada uno de los tres ensayos y el resultado expresado como porcentaje de la cantidad de HBsAg declarada por el fabricante.

Especificidad: En la **Tabla 2**, se muestran los valores de DO correspondientes al control negativo interno y a la dilución de menor concentración (0,625 ng/ml) de la vacuna hexavalente.

A partir de los promedios obtenidos, se calcularon el valor umbral y la relación $DO_{0,625}/\text{valor umbral}$ dando como resultado 0,084 y 2,869, respectivamente. Por otra parte, a continuación, se resumen los datos obtenidos para cada grupo de tratamiento: control negativo, Vacuna A y Vacuna B (**Tabla 3a.**) y los resultados del ANOVA (**Tabla 3b.**)

Precisión: Para cada una de las muestras, se informan los valores de DO por triplicado obtenidos para los tres puntos de concentración evaluados y el correspondiente cálculo del CV% (**Tabla 4a.**). A su vez, se informan los valores de CV% obtenidos por cada analista en la evaluación de la precisión intermedia (**Tabla 4b.**).

Linealidad: En las **Tablas 5a y 5b** se informan los resultados de la evaluación de la relación entre la concentración de HBsAg y la señal de DO, para la Muestra 1 y Muestra 2, respectivamente. Para los tres ensayos independientes realizados, se informan los valores de la pendiente (m) y el intercepto (b), según la ecuación de la recta: $y = mx + b$, con el correspondiente coeficiente de correlación (R^2) de la curva dosis-respuesta.

TABLA 1. RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL ANÁLISIS DEL PARÁMETRO EXACTITUD. NOTAR QUE LAS UNIDADES DE CONCENTRACIÓN SON mg/ml y µg/ml PARA LA MUESTRA 1 Y MUESTRA 2, RESPECTIVAMENTE.

	Muestra 1 (HBsAg declarado: 1,50 mg/ml)			Muestra 2 (HBsAg declarado: 20 µg/ml)		
Contenido de HBsAg estimado	1,53	1,48	1,39	19,22	21,70	21,09
Resultado (%)	102%	99%	93%	96%	109%	105%

TABLA 2. VALORES DE DO OBTENIDOS PARA EL CONTROL NEGATIVO Y LA MUESTRA DE VACUNA HEXAVALENTE A UNA DILUCIÓN 1/3200 (0,625 ng/ml).

	Control negativo	Vacuna hexavalente (0,625 ng/ ml)
DO (450/630nm)	0,045 0,043 0,044	0,220 0,234 0,270
Valor medio	0,044	0,241

TABLA 3A. RESUMEN DE DATOS PARA EL ANOVA. SE MUESTRAN LOS VALORES DE DO OBTENIDOS PARA CADA GRUPO.

TRATAMIENTO 1: CONTROL NEGATIVO;

TRATAMIENTO 2: VACUNA A

Y TRATAMIENTO 3: VACUNA B. N: NÚMERO DE DATOS POR TRATAMIENTO; DE: DESVÍO ESTÁNDAR.

Tratamientos	1	2	3	Total
DO (450/630nm)	0,047	0,042	0,042*	
	0,042	0,030	0,040	
	0,043	0,032	0,043	
	0,047	0,034	0,053	
	0,040	0,037	0,104	
	0,050	0,038	0,063	
	0,037	0,035	0,040	
	0,038	0,039	0,040	
	0,033	0,041	0,037	
N	9	9	9	27
ΣX	0,377	0,328	0,462	1,167
Media	0,042	0,036	0,051	0,043
ΣX^2	0,016	0,0121	0,0274	0,0555
DE	0,0055	0,004	0,0214	0,0139

* Dato anómalo reemplazado según Test de Dixon

TABLA 3B. RESULTADOS DEL ANOVA DE UN SOLO FACTOR.

NIVEL DE SIGNIFICANCIA A=0,05

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Inter- tratamientos	0,001	2	0,0005	3,04101	0,066504
Intra- tratamientos	0,004	24	0,0002		
Total	0,0051	26			

TABLA 4A. VALORES DE CV (%) OBTENIDOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD DE:
DESVÍO ESTÁNDAR; CV%: COEFICIENTE DE VARIACIÓN PORCENTUAL.

	Ensayo N°	Concentración (ng/ml)	DO (450/630 nm)			Media	DE	CV%
Muestra 1	I	2,4	1,616	1,614	1,662	1,631	0,027	2
		1,6	1,753	1,763	1,762	1,759	0,006	0
		0,6	1,664	1,631	1,690	1,662	0,030	2
	II	2,4	0,956	0,973	0,963	0,964	0,009	1
		1,6	1,102	1,090	1,128	1,107	0,019	2
		0,6	0,975	0,970	0,997	0,981	0,014	1
	III	2,4	0,525	0,508	0,530	0,521	0,012	2
		1,6	0,606	0,640	0,626	0,624	0,017	3
		0,6	0,545	0,551	0,560	0,552	0,008	1
Muestra 2	I	1,62	0,184	0,188	0,177	0,183	0,006	3
		1,08	0,204	0,214	0,221	0,213	0,009	4
		0,72	0,256	0,263	0,282	0,267	0,013	5
	II	1,62	0,135	0,127	0,133	0,132	0,004	3
		1,08	0,136	0,147	0,152	0,145	0,008	6
		0,72	0,175	0,180	0,178	0,178	0,003	1
	III	1,62	0,100	0,107	0,098	0,101	0,005	5
		1,08	0,101	0,109	0,117	0,109	0,008	7
		0,72	0,121	0,120	0,125	0,122	0,003	2

TABLA 4B. RESULTADOS DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA

	Analista 1			Analista 2		
Concentración (ng/ml)	2,4	1,2	0,6	2,4	1,2	0,6
DO (450/630 nm)	1,892	1,154	0,596	2,087	1,231	0,735
	1,735	1,045	0,563	1,958	1,261	0,678
	1,764	1,032	0,572	1,935	1,133	0,634
Media	1,764	1,032	0,577	1,993	1,208	0,682
Desvío Estándar	0,084	0,067	0,017	0,082	0,067	0,051
CV%	5	6	3	4	6	7

TABLA 5A. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO LINEALIDAD PARA LA MUESTRA 1

	Puntos utilizados	R ²	Pendiente (m)	Intercepto (b)
Muestra 1	5	0,9971	0,6852	0,0577
	4	0,9966	0,8436	0,0903
	4	0,9997	0,8722	0,0599

TABLA 5B. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO LINEALIDAD PARA LA MUESTRA 2.

	Puntos utilizados	R ²	Pendiente (m)	Intercepto (b)
Muestra 2	5	0,9917	0,1002	0,0472
	4	0,9959	0,1083	0,0247
	4	0,9945	0,1407	0,0212

DISCUSIÓN

La determinación del contenido antigénico en vacunas constituye uno de los ensayos esenciales de control de calidad llevados a cabo en el Laboratorio de Inmunobiológicos con el objetivo de verificar que las mismas tengan la potencia asignada por los elaboradores en la formulación final^[28]. Para ello, es sumamente importante contar con metodologías estandarizadas que permitan determinar la concentración de antígenos y que los resultados de éstas sean reproducibles y confiables^[29].

En el presente estudio se llevaron a cabo tres ensayos para la evaluación de exactitud y se observó que los valores del contenido de HBsAg estimados se encontraban dentro del rango de 90-110% de la cantidad declarada por el fabricante, demostrando que el método es lo suficientemente exacto para estimar el contenido del antígeno.

En cuanto a la evaluación de la especificidad, se encontró que para una dilución de 1/32000 (0,625ng/ml) de la muestra de vacuna hexavalente, la relación DO/valor Umbral mostró un valor de 2.69, siendo 1 el mínimo estipulado por el fabricante del kit para considerar una muestra como positiva. Esta capacidad de detectar al componente en el orden de los nanogramos demuestra la alta especificidad del método para discernir al analito (HBsAg) del resto de los componentes de la vacuna y de la matriz. Por otra parte, al comparar los resultados obtenidos para las muestras sin HBsAg (Vacuna A y B) y el control negativo, se determinó que el valor del estadístico calculado F (3,04101) fue mayor al p-valor (0,066504), por lo que es válido inferir que no existen diferencias significativas entre los tres grupos de tratamientos para un nivel de significancia de $\alpha=0,05$. En otras palabras, al analizar vacunas que no contienen el antígeno HBsAg, se obtienen resultados comparables a los valores de DO del control negativo, verificando que la técnica posee la capacidad de evaluar inequívocamente al analito en presencia de otros componentes, inclusive si éstos son otros antígenos que componen la misma formulación. Este resultado es de suma importancia porque permite la determinación del contenido de HBsAg en vacunas monovalentes y multivalentes como la séxtuple y la quintuple incluidas en el Calendario Nacional de Vacunación.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos del análisis de la repetibilidad, se encontró que el CV% entre las tres determinaciones fue menor al 10% tanto para la Muestra 1 de granel como para la Muestra 2 de producto terminado, estos niveles de variación son considerados aceptables para un ensayo analítico de estas características^[30,31] y se podría inferir que las variaciones encontradas cuando un mismo operador repite el ensayo, bajo las mismas condiciones experimentales, en distintos días, no son significativas. En adición, la variación entre ensayos realizados por diferentes analistas también fue menor al 10%, por lo que la anterior inferencia también sería aplicable a estos casos.

Con respecto a la linealidad y rango de trabajo, con el valor umbral calculado para cada ensayo (mínima cantidad de antígeno de HBsAg que el sistema de análisis puede detectar) se pudo establecer un rango de diluciones adecuado, de manera

tal que las estimaciones de absorbancia fueran mayores al umbral. Para ello, se probaron distintas diluciones de trabajo basadas en información disponible en bibliografía y en técnicas analíticas de los elaboradores. En este punto, es importante destacar la diferencia en el rango de concentraciones utilizado para cada muestra, esto se debería a que en la vacuna comercial, el antígeno se encuentra adsorbido a un soporte mineral (hidróxido de aluminio) que funciona como adyuvante y que podría interferir en la unión antígeno-anticuerpo, afectando la cuantificación del HBsAg^[32]. Con esta premisa, en el Laboratorio de Inmunobiológicos, se propuso evaluar a futuro la desabsorción de las vacunas de hepatitis B adsorbidas para estudiar la interferencia de este tratamiento en la determinación del contenido de HBsAg. En cuanto al coeficiente R^2 , en todos los casos fue mayor al valor de aceptación establecido de 0,990, verificándose la relación lineal entre la concentración de HBsAg y la señal DO.

En el contexto de este estudio es pertinente destacar que cada producto es único y, por lo tanto, la puesta a punto y la evaluación de parámetros deben realizarse sobre cada uno de ellos. En resumen, la gran ventaja del ELISA se debe a que es una técnica *in vitro* para la identificación y cuantificación de antígenos, por lo que se requieren cantidades mínimas de muestra y permite evaluar un gran número de vacunas por cada ensayo. Sin embargo, debido a características propias de cada kit, principalmente aquellas relacionadas con el anticuerpo adherido en la placa, el protocolo de puesta a punto deberá repetirse (con las variaciones correspondientes) si se trabaja con un kit de ELISA de otra procedencia.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que el método cumple con los criterios de aceptación establecidos para cada parámetro, por lo cual, la metodología analítica demostró ser adecuada para la identificación y cuantificación del HBsAg en las muestras ensayadas: preparación de antígeno purificado y vacuna contra la Hepatitis B ADN recombinante, considerando los resultados confiables y reproducibles.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Seeger C, Mason WS. *Hepatitis B virus biology*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64.1 (2000): 51-68.
- 2- Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. *The hepatitis B virus*. Nature 317.6037 (1985): 489-495.
- 3- Gavilanes F, Gonzalez-Ros JM, Peterson DL. *Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins*. Journal of biological chemistry 257.13, 1982: 7770-7777.
- 4- Brunetto MR et al. *Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers*. Gastroenterology 139.2, 2010: 483-490.
- 5- Ganem D, Prince AM. *Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences*. New England Journal of Medicine 350.11, 2004: 1118-1129.

- 6- Jilg W. *Novel hepatitis B vaccines*. Vaccine 16, 1998: S65-S68.
- 7- World Health Organization. *Global hepatitis report 2017*. World Health Organization, 2017.
- 8- Liaw YF, Chu CM. *Hepatitis B virus infection*. The lancet 373.9663, 2009: 582-592.
- 9- Perz JF, et al. *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide*. Journal of hepatology 45.4, 2006: 529-538.
- 10- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Documento: *Las Hepatitis Virales en la Argentina*. 2014.
- 11- Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Nación Argentina. *Boletín N°1 sobre las hepatitis virales en Argentina*. Año 1- octubre 2019.
- 12- Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. *The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview*. Vaccine 26.49, 2008: 6266-6273.
- 13- Paladini S, Van Damme P, Zanetti AR. *The worldwide impact of vaccination on the control and protection of viral hepatitis B*. Digestive and Liver Disease 43, 2011: S2-S7.
- 14- Hilleman MR. *Plasma-derived hepatitis B vaccine: a breakthrough in preventive medicine*. Hepatitis B vaccines in clinical practice. New York: Marcel Dekker, 1992: 17-39.
- 15- Davidson M, Krugman S. *Recombinant yeast hepatitis B vaccine compared with plasma-derived vaccine: immunogenicity and effect of a booster dose*. Journal of infection 13, 1986: 31-38.
- 16- Stephenne J. *Recombinant versus plasma-derived hepatitis B vaccines: issues of safety, immunogenicity and cost-effectiveness*. Vaccine 6.4, 1988: 299-303.
- 17- Stecher D, Katz N, Vizzotti C. *Hepatitis B en Argentina. Situación actual y estrategia de vacunación universal para su control y eliminación*. Actual. SIDA. infectol 22.83, 2014: 18-21.
- 18- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. *Lineamientos técnicos: vacuna contra el virus de la hepatitis b - vacunación universal*. Año 2012, Argentina.
- 19- World Health Organization, et al. *Guidelines for independent lot release of vaccines by regulatory authorities*. WHO Technical Report Series, 2013, No 978.
- 20- Mogetta, MH; Cassano P, Aprea P. *Hepatitis b vaccine: registered products in argentina and general methods for potency assessment*. ANMAT. Revista Ciencia Reguladora 2, 2018: 20-22.
- 21- WHO Expert Committee on Biological Standardization. *Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant hepatitis B vaccines*. Annex 4 to WHO Technical Report Series, No. 889
- 22- World Health Organization. *Technical Report Series, Requirements for hepatitis B vaccines made by recombinant DNA techniques*. 1999. No. 786.
- 23- World Health Organization. *Hepatitis B Potency Testing Standardization. Report off a Meeting WHO/SEARO*, New Delhi, April, 2001.
- 24- European Pharmacopoeia 8.0. *Hepatitis B vaccine (rDNA)*. 2011. Monografía 1056:857-858
- 25- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. *Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques* 1978. Voller y col. Journal of Clinical Pathology. Jun; 31(6): 507-520.
- 26- Miziara ID, et al. *Research ethics in animal models*. Brazilian journal of otorhinolaryngology 78.2, 2012: 128-131.
- 27- ICH. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. ICH Topic Q 2 (R1). CPMP/ICH/381/95. 1995.
- 28- Verch T, Trausch JJ, Shank-Retzlaff M. *Principles of vaccine potency assays*. Bioanalysis 10.3, 2018: 163-180
- 29- McVey, DS, Jeffrey EG, Olson SC. *A review of the effectiveness of vaccine potency control testing*. International journal for parasitology 33.5-6, 2003: 507-516.
- 30- Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X, Blanco R. *Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas*. VacciMonitor. 2000; 9(1):17-20.
- 31- Little LE. *Validation of immunological and Biological Assays*. BioPharmaceutical. 1995; 36-42.
- 32- Chittineni SP, Maheshwari SC. *Improved Method For Hepatitis B Vaccine In-Vitro Potency*. International Journal of Pharmaceutical Science Invention 3. 5, 2014: 39-42.

