

## Estabilidad de las tiras de nitrocelulosa recubiertas con antígenos de VIH-1 y HTLV-I de los sistemas DAVIH-BLOT y DAVIH-BLOT-HTLV-I.

**Otto Cruz-Sui, Lucy Montano-Tamayo\*, María Teresa Pérez-Guevara\*\*, Dervel Felipe Díaz-Herrera \*\*, Yanelis Cruz-Santana\*\*\*, Kenia Romero-Martínez \*\*.**

Licenciado en Biología, Máster en Ciencias Bioquímicas, Doctor en Ciencias de la Salud, Investigador Titular. \*Técnico Medio en Química Analítica. \*\*Licenciado en Bioquímica, Máster en Ciencias Bioquímicas, Investigador Auxiliar. \*\*\*Licenciada en Química, Aspirante a Investigador. Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. cicdc@infomed.sld.cu

Recibido: 12 de noviembre de 2015.

Aceptado: 19 de diciembre de 2016.

Palabras clave: estabilidad de membranas de Western blot, estabilidad de diagnosticadores para VIH/HTLV.

Key words: Western blot membrane stability, IVD stability for HIV/HTL.

**RESUMEN.** La estabilidad de los diagnosticadores como productos biológicos sensibles a factores ambientales, dependen de condiciones de almacenamiento adecuadas que permitan mantener su actividad biológica y evitar la degradación. Los sistemas de Western blot DAVIH-BLOT y DAVIH-BLOT-HTLV-I para la confirmación de la infección por VIH-1 y HTLV-I tienen registrada una estabilidad de 18 y 12 meses respectivamente. Se realizó un estudio de estabilidad a largo plazo de los componentes R1, tiras de nitrocelulosa recubiertas con antígeno de VIH-1 y de HTLV-I, de estos sistemas, con el fin de mantener o extender su periodo de validez. Se evaluaron sus características organolépticas y funcionales frente a muestras de reactividad conocida, empleándose 14 lotes de producción del DAVIH-BLOT con 24, 30, 36 y más de 96 meses, así como 9 lotes de DAVIH-BLOT-HTLV-I con 24, 48 y 96 meses. Ambos reactivos mantuvieron sus características organolépticas y funcionales en todos los periodos evaluados. Se pudo extender su periodo de validez a cuatro años con un 50 % de cobertura.

**ABSTRACT.** Stability of diagnosticians as biological products sensitive to environmental factors, depend on proper storage conditions to maintain their biological activity and prevent degradation. DAVIH-BLOT and DAVIH-BLOT-HTLV-I Western blot systems for confirmation of HIV-1 and HTLV-I, have a registered stability of 18 and 12 months respectively. A long term stability study to components R1 of these systems was performed, nitrocellulose strips coated with antigen of HIV-1 and HTLV-I, in order to maintain or extend their shelf life. Organoleptic and functional characteristics with samples of known reactivity were evaluated, using 14 batches of DAVIH-BLOT with 24, 30, 36 and 96 months and 9 batches of DAVIH-BLOT HTLV-I with 24, 48 and 96 months. Both reagents maintained their organoleptic and functional features in all evaluated periods. It could extend its validity period to four years with 50% coverage.

### INTRODUCCIÓN

Los estudios de estabilidad de los diagnosticadores constituyen requisitos indispensables para su registro, pues permiten obtener la información necesaria y suficiente para amparar la vida útil del producto y establecer el periodo de validez, el cual garantiza la conservación de las características físico-químicas, biológicas o funcionales de todos sus componentes en el envase primario en el que se comercializa <sup>1,2</sup>.

Los productos biológicos/ biotecnológicos son sensibles a factores ambientales tales como los cambios de temperatura, la oxidación, la luz entre otros, por lo que deben permanecer en estrictas condiciones de almacenamiento que garanticen mantener su actividad biológica y evitar la degradación. Los estudios de estabilidad a largo plazo, se recomiendan realizar en condiciones de almacenamiento reales, para obtener la información que avala el tiempo y las condiciones en anaqueles, así como actualizar los datos iniciales de la estabilidad <sup>3,4</sup>.

Las tiras de nitrocelulosa (R1) cubiertas con antígeno del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y del virus linfotrópico de células T humanas (HTLV-I) son los componentes principales de los sistemas Western blot para la confirmación de la infección por VIH-1 y HTLV-I (DAVIH- BLOT y DAVIH-BLOT-HTLV-I) y tienen registrada una estabilidad a tiempo real de 18 y 12 meses respectivamente <sup>5</sup>. El objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad a largo plazo de estos componentes para confirmar o extender su periodo de validez <sup>2</sup>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ensayos

Se evaluaron las características organolépticas y funcionales de los componentes R1, que, según las especificaciones, consistieron en tiras blancas de nitrocelulosa de 3 mm de ancho x 105 mm de largo, libres de contaminantes, envasadas en tubos de centrífuga de 10 mL con tapa de roscas herméticas y almacenadas a una temperatura de 2 a 8 °C, hasta el momento de su uso. Para el estudio de las características organolépticas se inspeccionó por simple visualización: el tamaño y color de las tiras reactivas, así como la posible presencia de contaminantes en su superficie. Se chequearon las características funcionales de las pruebas que se realizaron según las instrucciones del fabricante. Los ensayos se consideraron válidos si cumplían los siguientes límites de aceptación:

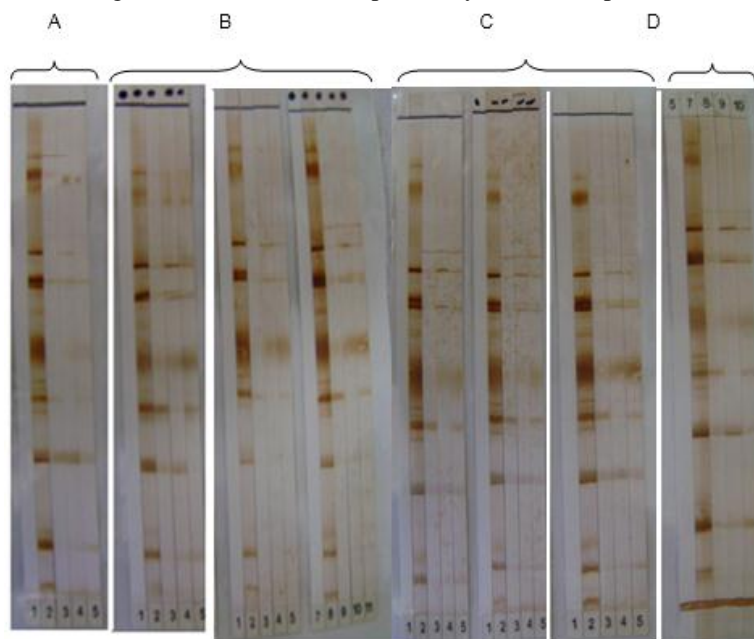
- Ausencia de bandas en los sueros controles negativos.
- Presencia de anticuerpos a todas las proteínas de los genes estructurales de ambos virus en los respectivos sueros controles positivos.
- Presencia de anticuerpos a las proteínas virales en los sueros débiles positivos cuyo perfil serológico cumpla el criterio mínimo de positividad.

Se utilizó el criterio de positividad para el VIH-1 y el HTLV-I recomendado por la OMS <sup>6</sup>:

- **Positivo a VIH-1:** reactividad a dos bandas de env y pueden estar o no bandas de gag y pol.
- **Positivo a HTLV-I:** reactividad contra una banda de env y una de gag.
- **Negativo:** No se observan bandas de los genes estructurales (env, gag, pol) o solamente aparece la p17 en el VIH-1.
- **Indeterminado:** Otros perfiles no considerados como positivo o negativo.

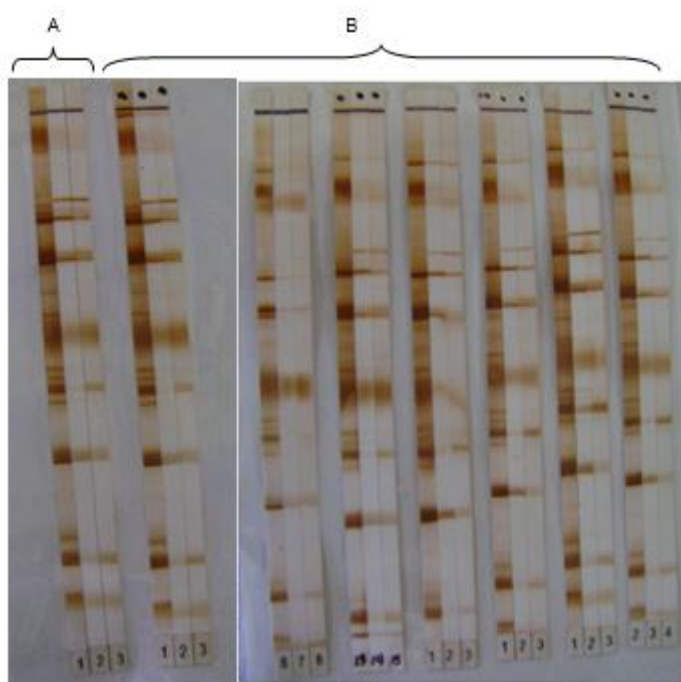
### Lotes y frecuencia de ensayo

Se evaluaron 14 lotes de producción industrial del R1 del sistema DAVIH-BLOT con 24, 30, 36 y 96 meses de producidas, así como 9 lotes de R1 del sistema DAVIH-BLOT-HTLV-I con 24, 48 y 96 meses de producidos. Esta diferencia en los periodos de evaluación, se corresponde simplemente con la disponibilidad de estuches en anaqueles. Ambos componentes, estaban almacenados entre 2 y 8 °C en su envase definitivo. Se empleó un R1 control para cada uno que consistió en tiras de nitrocelulosa recubiertas con antígeno de VIH-1 y HTLV-I respectivamente con 12 meses de producidas. Para las R1 de VIH-1, se ensayaron cinco tiras de cada lote con un panel que contenía un suero control negativo, un suero control positivo y tres sueros positivos débiles por ELISA o Western blot (Fig. 1).



**Fig 1.** Patrones de Western blot del sistema DAVIH-BLOT en siete lotes de tiras recubiertas con antígeno de VIH-1. A) Tiras del lote control (12 meses); B) Tiras de tres lotes con 24 meses; C) Tiras de tres lotes con 30 meses y D) Tiras de un lote con 36 meses.

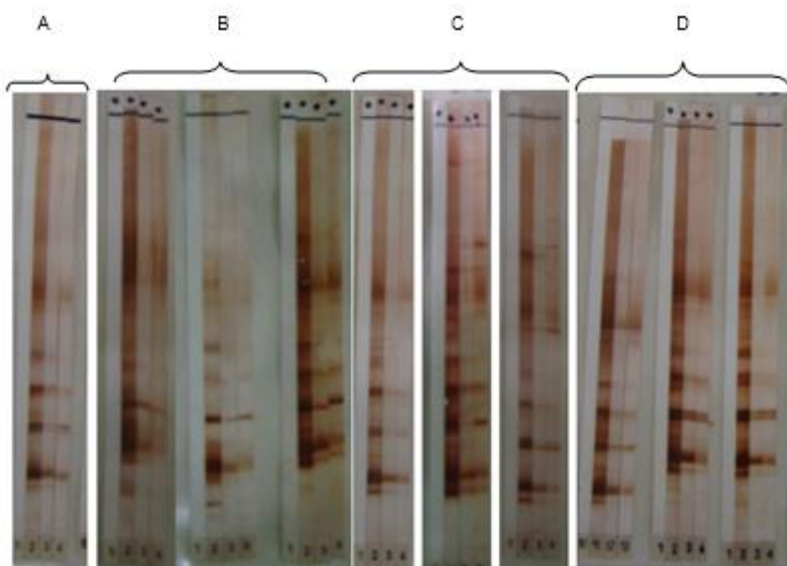
En las R1 con 96 meses, se ensayaron tres tiras de cada lote con un suero control positivo y dos muestras de sueros positivos débiles (Fig. 2), no se ensayaron los controles negativos por escasa disponibilidad de tiras. El resto de los componentes empleados en el ensayo cumplían con su periodo de validez.



**Fig. 2.** Patrones de Western blot del sistema DAVIH-BLOT en ocho lotes de tiras recubiertas con antígeno de VIH-1. A) Tiras del lote control (12 meses); B) Tiras de siete lotes con 96 meses.

Para establecer el nuevo periodo de validez del ensayo, se consideró el % de cobertura de la estabilidad, definido como el margen de seguridad adecuado que se incluye en los criterios de estabilidad y que cubre las incertidumbres del diagnosticador <sup>1,7</sup>.

Para las R1 de HTLV-I, se ensayaron cuatro tiras de cada lote con un suero control negativo, un suero control positivo y dos muestras de sueros positivos débiles (Fig. 3). El resto de los componentes cumplían con su periodo de validez.



**Fig. 3.** Patrones de Western blot del sistema DAVIH-BLOT-HTLV-I en diez lotes de tiras recubiertas con antígeno de HTLV-I. A) Tiras del lote control (12 meses); B) Tiras de tres lotes con 24 meses; C) Tiras de tres lotes con 48 meses y D) Tiras de tres lotes con 96 meses.

### RESULTADOS

Todas las R1 evaluadas cumplieron con el criterio de aceptación y no se observaron diferencias con respecto a los controles. Se pudo observar que la intensidad de la reactividad de las bandas de los lotes controles no diferían del resto de las R1. Las características organolépticas cumplieron las especificaciones establecidas para ambos componentes. No se observaron cambios en el tamaño, color, ni presencia de contaminantes ambientales.

En la tabla 1 se exponen los resultados de las evaluaciones de los lotes de R1 del sistema DAVIH-BLOT en los periodos de tiempo de almacenamiento evaluados con el panel de muestras de sueros de referencia. Los sueros controles positivos en las tiras de R1 mantuvieron el patrón de bandas con similar intensidad a las R1 control en todos los periodos de tiempo evaluados. Las muestras de sueros débiles positivos de las tiras de R1 evaluadas mostraron un patrón de bandas de menor intensidad, señaladas con el signo (+/-) similares a las R1 control. En todos los casos, las muestras débiles positivas revelaron un patrón de reactividad positivo. Este perfil de reactividad es específico en cada muestra, de acuerdo a la dinámica de respuesta de anticuerpos del paciente en el momento en que se toma. El patrón de reactividad; aunque siempre resultó débil para algunas proteínas estructurales, según se muestra en la tabla, no cambió con el tiempo.

**Tabla 1** Reactividad de muestras de sueros negativos y positivos a VIH-1 previamente evaluadas contra las proteínas virales estructurales en lotes de R1 del DAVIH-BLOT con diferentes periodos de almacenamiento.

Tiempo almacenado del R1	Muestra	Presencia de bandas estructurales del VIH-1								
		17	24	34	41	53	55	68	120	160
12 Meses (R1 Control)	Negativa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positiva VIH-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Débil positiva VIH-1 (01)	-	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+	+/-
	Débil positiva VIH-1 (02)	+/-	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Débil positiva VIH-1 (03)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
24 meses	Negativa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positiva VIH-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Débil positiva VIH-1 (01)	-	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+	+/-
	Débil positiva VIH-1 (02)	+/-	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Débil positiva VIH-1 (03)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
30 meses	Negativa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positiva VIH-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Débil positiva VIH-1 (01)	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-
	Débil positiva VIH-1 (02)	+/-	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Débil positiva VIH-1 (03)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
36 meses	Negativa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positiva VIH-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Débil positiva VIH-1 (01)	-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-	+/-
	Débil positiva VIH-1 (02)	+/-	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Débil positiva VIH-1 (03)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
Más de 96 meses	Positiva	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Débil positiva VIH-1 (01)	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Débil positiva VIH-1 (02)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

En la tabla 2 se exponen los resultados de las evaluaciones de las R1 del sistema DAVIH-BLOT-HTLV-I. Los patrones de bandas de las tiras de R1 en los diferentes periodos de tiempo fueron similares a las R1 empleadas como control al comparar, tanto los sueros positivos entre sí como los sueros positivos débiles. Estos últimos mantuvieron

su condición de positivos en todos los periodos de almacenamiento analizados. Los patrones de reactividad débil no variaron con el tiempo.

**Tabla 2:** Reactividad de muestras de sueros negativos y positivos a HTLV-I previamente evaluadas contra las proteínas virales estructurales en lotes de R1 del DAVIH-BLOT-HTLV-I con diferentes periodos de almacenamiento.

Tiempo de almacenado el R1	Muestra	Presencia de bandas estructurales del HTLV-I							
		19	24	26	28	36	gp46	53	
12 meses (R1 Control)	Negativa	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positiva HTLV-I	+	+	+	+	+	+	+	+
	Débil positiva HTLV-I (01)	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Débil positiva HTLV-I (02)	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
24 meses	Negativa	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positiva HTLV-I	+	+	+	+	+	+	+	+
	Débil positiva HTLV-I (01)	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Débil positivo HTLV-I (02)	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
48 meses	Negativa	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positiva HTLV-I	+	+	+	+	+	+	+	+
	Débil positiva HTLV-I (01)	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Débil positiva HTLV-I (02)	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
96 meses	Negativa	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positiva HTLV-I	+	+	+	+	+	+	+	+
	Débil positiva HTLV-I (01)	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Débil positiva HTLV-I (02)	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

## DISCUSIÓN

Los estudios de estabilidad a largo plazo en tiempo real están diseñados para evaluar la conservación de las características físicas, químicas y en los casos en que se requiera, microbiológicas y de actividad biológica del producto, en su envase primario definitivo. El propósito de tales estudios es el aseguramiento, comprobación y/o extensión del período de validez del producto. En los estudios de estabilidad tanto la duración, como las condiciones de almacenamiento deben ser adecuadas y deberá incluir el tiempo de almacenamiento, la transportación y el uso previsto según su especificación <sup>1</sup>. Las tiras de nitrocelulosa recubiertas con antígenos de VIH-1 y HTLV-I producidas industrialmente y envasadas según las especificaciones del fabricante, permitieron la conservación de las mismas en condiciones reales. Estos componentes tenían inicialmente un periodo de validez de 18 y 12 meses, dado por los estudios de estabilidad iniciales realizados para el registro de los diagnosticadores DAVIH-BLOT y DAVIH-BLOT-HTLV-I respectivamente. El estudio de estabilidad de estos componentes de manera independiente del resto de los reactivos del estuche, para extender el periodo de validez de los sistemas, constituye una mejora conveniente, ya que posibilita su elaboración y almacenamiento según las necesidades desde el punto de vista productivo.

Cuando se producen las tiras de nitrocelulosa recubiertas con antígenos, el secado es un paso primordial para evitar la contaminación por hongos, que probablemente constituye la única contaminación factible con consecuencias desfavorables para su estabilidad; no obstante, se debe evitar la exposición al calor para impedir la calcinación según recomiendan los fabricantes, otro de los factores contrarios a su durabilidad. En otros reportes donde emplean tiras de nitrocelulosa para ensayos de flujo lateral e inmunoensayos en línea, también identifican al secado como uno de los procesos más críticos para el logro de la consistencia, estabilidad y la sensibilidad <sup>8,9</sup>. Durante la producción de una tira, el proceso de secado, tiene como objetivo, lograr un recubrimiento estable de la proteína inmunoreactiva. El grado de secado, el método y tiempo con que se realiza el mismo, son críticos para procurar una proteína estable activa sobre la superficie de la membrana. Resulta imprescindible el control de los parámetros de secado para que la proteína se reestructure hacia una conformación activa después del mismo. El secado de las tiras de nitrocelulosa evaluadas en este estudio se realizó a temperatura de laboratorio (25 °C), bajo condiciones microbiológicas no controladas y con una humedad relativa de más del 60 %. Este procedimiento se realiza en nuestro laboratorio hace más de 25 años; aunque no se ha estudiado con más profundidad, las evidencias derivadas del presente trabajo, muestran indirectamente la robustez y la eficacia del proceso de secado de las membranas recubiertas con antígenos naturales de VIH-1 y HTLV-I.

Se pudo comprobar que las proteínas virales adsorbidas en la superficie mantuvieron su capacidad de reaccionar con los respectivos sueros positivos al VIH-1 y HTLV-I, al revelar los patrones de reactividad característicos por Western blot de sus proteínas estructurales. Las muestras de sueros positivos débiles, mantuvieron su condición de positivas al revelar una intensidad débil sostenida en todos los ensayos. Se evidenció que las proteínas mantuvieron la actividad de reconocimiento molecular por meses. Datos referidos de los fabricantes, Whatman® / Schleicher & Schuell®, reportan que las membranas de nitrocelulosa pura o reforzada, como las empleadas en este estudio, Protran® y

Optitran®, garantizan la más alta capacidad de unión posible de proteínas y tienen como atributo ventajoso, una excelente vida útil comprobada de proteínas adsorbidas en su superficie <sup>10, 11</sup>.

Un aspecto importante a tener en cuenta para los estudios de estabilidad es la frecuencia de ensayos. Cuando se propone un plazo de validez o vida de estante de más de 1 año, se recomienda estudiar la estabilidad cada 3 meses durante el primer año de almacenamiento, durante 6 meses el segundo año y después anualmente (0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 y 60 meses). Mientras que los mencionados intervalos son apropiados en la etapa de pre aprobación o pre registro, los ensayos post licencia pueden reducirse cuando se dispone de información demostrativa de una adecuada estabilidad <sup>4</sup>.

## CONCLUSIONES

Lograr reactivos con un alto grado de estabilidad, constituye sin duda alguna una ventaja en la fabricación de medios diagnósticos. Los resultados obtenidos demostraron que, en las condiciones de estudio empleadas, la estabilidad del componente R1 se mantuvo durante todo el periodo evaluado. Los componentes R1 del DAVIH-BLOT y DAVIH-BLOT-HTLV-I mantuvieron sus características organolépticas y funcionales durante 96 meses en sus envases primarios definitivos, comprobándose que ambos componentes mantienen su funcionalidad durante este período y que la temperatura de almacenamiento especificada garantiza su conservación. Como resultado del estudio, se propone extender el periodo de validez del componente R1 de ambos sistemas hasta 48 meses, que representa el 50 % del periodo de tiempo de estabilidad analizada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación 23-2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. CECMED, 2000. Disponible en: [http://www.cecmed.sld.cu/Pages/Reg\\_LicProd.htm](http://www.cecmed.sld.cu/Pages/Reg_LicProd.htm)
2. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación 20. Buenas Prácticas de Fabricación para Diagnosticadores, CECMED, 2004. Disponible en: [http://www.cecmed.sld.cu/Pages/Reg\\_Diag.htm](http://www.cecmed.sld.cu/Pages/Reg_Diag.htm)
3. Romero K, Pérez MT, Fragas A, Peña Y, Izquierdo M. Estudio de estabilidad del sistema ELISA DAVIH AgP24. *Rev Cubana Med Trop* 2009; 61(1): 20-5
4. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación 25-2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos biológicos y biotecnológicos. CECMED, 2000. Disponible en: [http://www.cecmed.sld.cu/Pages/Reg\\_LicProd.htm](http://www.cecmed.sld.cu/Pages/Reg_LicProd.htm)
5. CECMED. Requisitos generales para el registro de los diagnosticadores. Regulación 8/2014. Disponible en <http://www.cecmed.sld.cu>
6. WHO Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Proposed WHO criteria for interpreting results from Western Blot assays for HIV-1, HIV-2 and HTLV-I/HTLV-II. *Wkly Epidem Rec* 1990, 65: 281-283.
7. Norma Cubana NC-EN 13640. Estudios de estabilidad de diagnosticadores, 2004.
8. O'Farrell, B.J. Lateral Flow Immunoassay Systems: Evolution from the Current State of the Art to the Next Generation of Highly Sensitive, Quantitative Rapid Assays. *The Immunoassay Handbook*. Chapter 2.4. Lateral Flow Immunoassay Systems. Pp 92-93. Elsevier Ltd. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00007-5>
9. Díaz DF, Cruz O, Montano L, Silva E. Evaluation of the immobilization of one HIV-2 gp36 peptide in nitrocellulose membrane. *Rev Cubana Med Trop* 2011; 63.
10. Whatman / Schleicher & Schuell. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/z258644?lang=en&region=CU>
11. Nitrocellulose membranes developed for protein research. *Membrane Technology*. Volume 2005, Issue 9, September 2005.