



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA

**LABORATORIOS DE BIOLÓGICOS Y REACTIVOS
DE MÉXICO, S.A. DE C.V.**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA DE
CONCENTRACIÓN EN VACUNOLOGÍA**

*“Análisis cualitativo de parámetros de desempeño del método de
inhibición de la hemaglutinación para determinar anticuerpos contra el
virus de influenza”*

ARTICULO ENVIADO

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
DE LA SALUD CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN
VACUNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

IBT. ELOISA ARIAS TOLEDO

Director

M. en C. Samuel Ponce de León Rosales

Asesores:

Dra. Lourdes García García

Dra. Celia Alpuche Aranda

M. en C. Maribel Esparza Robles

M. en C. Nelson Álvarez Anell

Análisis cualitativo de parámetros de desempeño del método de inhibición de hemaglutinación para determinar anticuerpos contra el virus de influenza

Análisis cualitativo del método de inhibición de hemaglutinación

Eloisa Arias-Toledo Ing Biot,⁽¹⁾ Lourdes García-García D en C,⁽²⁾ Celia Alpuche-Aranda D en C,⁽³⁾ Maribel Esparza-Robles M en C,⁽¹⁾ Nelson Jesús Álvarez-Anell M en C,⁽¹⁾ Deyanira Castañeda Desales M en C,⁽²⁾ Doris Arellano Quintanilla Biol,⁽²⁾ Claudia Gómez Cerón M en A,⁽²⁾ Elizabeth Ferreira-Guerrero D en C,⁽²⁾ Samuel Ponce de León-Rosales, MC, M en C.⁽¹⁾

(1) Biológicos y Reactivos de México S.A. de C. V. (BIRMEX)

(2) Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)

(3) Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE)

Autor correspondiente:

Samuel Ponce de León Rosales

Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V.

Amores 1240 Col. del Valle. Deleg. Benito Juárez.

Cp. 03100. México D.F.

Correo electrónico: sponce@birmex.gob.mx

Análisis cualitativo de parámetros de desempeño del método de inhibición de hemaglutinación para determinar anticuerpos contra el virus de influenza

Resumen

Objetivo. Implementar y evaluar los parámetros de desempeño del método bioanalítico de inhibición de hemaglutinación (IHA), el cual se utiliza, para determinar el título de anticuerpos contra el virus de influenza en sueros de pacientes humanos.

Material y métodos. La cepa de virus de influenza A/California/7/2009 se utilizó para implementar y evaluar el método de IHA. Se establecieron los controles positivo, negativo y estándar. Los parámetros de desempeño evaluados fueron: repetibilidad, precisión intermedia, exactitud, estabilidad y especificidad.

Resultados. La implementación del método de IHA en el Laboratorio de Evaluación de Vacunas Virales (LEVV) del INSP fue satisfactoria y la evaluación de parámetros de desempeño demostró que el método es preciso, exacto, específico y estable.

Discusión. Los resultados muestran que el método de IHA puede utilizarse como método de rutina en el LEVV con el fin de evaluar la eficacia en las vacunas de influenza y justificar la toma de decisiones con resultados oportunos y confiables.

Palabras clave en español: Inhibición de la hemaglutinación, virus de Influenza, título de anticuerpos, análisis cualitativo y parámetros de desempeño.

Qualitative analysis of performance parameters of the hemagglutination inhibition method to determine antibodies against influenza virus

Summary

Objective. Implement and evaluate performance parameters of the bioanalytical method of inhibition of hemagglutination (IHA), which is used to determine the level of antibodies against the influenza virus in sera of human patients.

Material and methods. The influenza virus strain *A/California/7/2009* was used to implement and evaluate the method of IHA. Controls positive, negative and standard were established. The performance parameters evaluated were: repeatability, intermediate precision, accuracy, stability and specificity.

Results. The IHA method implementation in at the laboratory evaluation of viral vaccines (LEVV) was satisfactory and evaluation of performance parameters showed that the method is precise, accurate, specific and stable.

Discussion. The results show that the method of IHA can be used as a routine method in the LEVV that belong to the INSP and thus evaluate the effectiveness of influenza vaccines and justify decisions with timely and reliable results.

English keywords: Inhibition of hemagglutination, influenza virus, antibody titer, qualitative method and performance parameters.

Introducción

La medición de los niveles de anticuerpos contra el virus de influenza en suero, se ha empleado como un marcador de una infección previa, ya sea por el virus silvestre o el virus vacunal y se ha relacionado también con la protección contra la enfermedad. El diagnóstico de influenza depende de aspectos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio; para este último, existe una gran variedad de métodos que se agrupan en: aquellos que revelan a través de serología anticuerpos contra el virus o aquellos que detectan directamente al virus como el aislamiento viral, detección de ácidos nucleicos del virus por RT-PCR, la detección de antígenos virales por pruebas de inmunofluorescencia y/o a través de pruebas de diagnóstico rápido¹. La elección de que método se debe de utilizar va a depender del objetivo que se desea alcanzar, además, de considerar una serie de factores como: la sensibilidad y la especificidad del método, la complejidad de su realización, el tiempo de respuesta, los costos asociados y la disponibilidad de los reactivos y materiales entre otros. Los ensayos serológicos se utilizan cuando las muestras para aislamiento viral o detección de antígenos resultan negativas, inadecuadas o no están disponibles, además de que pueden detectar la seroconversión de anticuerpos específicos, en muestras de suero en fase de enfermedad aguda y convaleciente. Algunos métodos bioanalíticos descritos para medir la respuesta de anticuerpos contra el virus de la influenza son: fijación de complemento, inhibición de la hemaglutinación (IHA), hemólisis radial, microneutralización (MN) y ensayos inmunoenzimáticos¹. Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda utilizar los ensayos de inhibición de la hemaglutinación (IHA) y microneutralización (MN) como el “estándar de oro” para evaluar la respuesta inmune contra la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza,^{2,3,1} ya que pueden diferenciar respuestas serológicas específicas de cepa y particulares de subtipo (incluyendo H5N1). El método de IHA es un método tradicional descrito por Hirst

en 1942 y modificada por Salk en 1944, el principio del método pone de manifiesto como interfiere la unión entre la HA viral y los receptores de los eritrocitos cuando en la reacción aparecen anticuerpos específicos contra esa HA, inhibiendo así, la hemaglutinación con los eritrocitos^{4,5,6,7}. Este método es relativamente sencillo, no implica costos elevados y es confiable siempre y cuando esté cumpla con los criterios de validez propios del método. Algunas desventajas del método de IHA incluyen la necesidad de tener que remover los inhibidores no específicos que se encuentran de forma natural en los sueros; ajustar el antígeno cada vez que se realiza la prueba y contar con el personal entrenado en la lectura de los resultados de la prueba. Sin embargo, la OMS recomienda este ensayo en la vigilancia global de influenza⁸, además; de que los resultados para este método pueden tenerse en dos días, lo que permite que sean útiles para investigaciones operativas durante brotes.

Debido a que el ensayo de IHA no es un método normalizado, es decir, que no aparece publicado en normas oficiales nacionales, regionales o internacionales; es necesario, garantizar que el método satisface los requisitos para su aplicación analítica, a través de la evaluación de ciertos parámetros de desempeño que demuestren que el método es repetible, reproducible, específico y estable a ciertas condiciones. Por lo anterior, el presente estudio describe como se realizó la implementación del método de IHA y la evaluación de los parámetros de desempeño, en las instalaciones del Laboratorio de Evaluación de Vacunas Virales (LEVV) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)

Material y Métodos

Diseño del estudio: El diseño se basó en implementar el método de IHA en el LEVV del INSP y evaluar los parámetros de desempeño que demostraran mediante estudios de

laboratorio; que las características de desempeño del método de IHA, satisfacen los requisitos para su aplicación bioanalítica.

Virus de influenza.- La cepa de virus utilizada fue A/California/7/2009 H1N1. Para obtener un volumen viral suficiente para desarrollar el presente trabajo y estudios posteriores, la multiplicación de virus se realizó utilizando la plataforma de huevos embrionados⁹, la cual consiste en realizar diferentes diluciones del virus e inocularlas en el líquido alantoideo de cada uno de los huevos e incubarlos a 37 °C por 48 horas, refrigerarlos a 4 °C durante toda la noche. Para realizar la cosecha al siguiente día, se retira el cascaron que se encuentra sobre la cámara de aire y se rompe la membrana corioalantoide y con una pipeta de 10 mL se extrae todo el líquido alantoideo, el cual debe ser lo más claro posible. En promedio se obtiene entre 8 y 12 mL de líquido alantoideo por huevo. El volumen final de virus por dilución se centrifuga a 2000 rpm por 10 minutos con el fin de retirar residuos de sangre y tejido. Para conocer el título viral se realizó la prueba de hemaglutinación^{10,9} en una microplaca de 96 pozos, donde se adiciona 50 µL de regulador salino de fosfatos (PBS) frío a los pozos de la fila A, B (por duplicado) a partir de A2 y B2 hasta A12 y B12 y a todos los pozos de la fila D (control de eritrocitos) y 100 µL de virus a los pozos A1 y B1. Se realizaron diluciones seriadas de A y B transfiriendo 50 µL de virus del pozo A1 a A2, de A2 a A3 y así sucesivamente hasta A12 y B12; se descartaron los últimos 50 µL, a continuación se agregó 50 µL de la suspensión de eritrocitos al 0.5% en todos los pozos que había dilución de virus incluida la fila D; la placa se tapó y agitó por 30 minutos se mantuvo a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo la placa se inclina a un ángulo entre 45 - 60 grados y se espera a que en la columna H caiga por gravedad el botón de eritrocitos en forma de lágrima para empezar a leer el título de virus. La dilución más alta de virus en el que se observó hemaglutinación completa, se consideró como el punto final y el recíproco de esa dilución es el título de

unidades hemaglutinantes (UHA) que tiene el virus de influenza. Con base en el título del virus se prepara la dilución de trabajo la cual debe de contener 8 UHA/50 mL. Se preparó un volumen final de 160 mL en donde 5 partes eran de virus (dilución 256) y 155 partes eran de PBS. Para confirmar que el virus presenta 8 UHA/50 mL se hizo una retitulación viral. El virus se mantuvo en hielo o refrigeración mientras fue utilizado y se almaceno a -70 °C para ensayos posteriores. Cuando el título de HA del virus es mayor a 64 UHA antes de ajustarse a 8 UHA/50 mL, el CDC recomienda utilizar esta cepa viral en el método de IHA¹⁰.

Eritrocitos de pava: El virus de influenza normalmente ingresa al organismo por nariz o boca e infecta a las células que recubren el tracto respiratorio, a través de la unión entre la hemaglutinina del virus y el ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) presente en las superficies de las células de los eritrocitos, esta unión define el tropismo de los virus de influenza por los distintos tipos de enlaces del ácido siálico con el azúcar que las precede en la cadena de carbohidratos, de este modo, el carbono 2 del ácido siálico terminal puede unirse al carbono 3 o 6 de la galactosa, formando enlaces α 2,3 y α 2,6 respectivamente. Los virus aislados de humanos se unen principalmente a ácidos siálicos en unión α 2,6 y los virus aviares se unen a ácidos siálicos en unión α 2,3. Partiendo del criterio anterior, se seleccionó al ave que tuviera el mayor porcentaje de receptores de ácidos siálicos con unión α 2,6, siendo las pavas las que tienen mayor porcentaje de este tipo de enlace respecto a otro tipo de aves domésticas y mamíferos, con 50 % de ácidos siálicos con unión α 2,6 y 50 % en unión α 2,3¹. Los eritrocitos se obtuvieron de aproximadamente 5 mL de sangre que se extrajeron de la pava, los cuales se combinaron con un volumen igual de una solución de Alsever's, la cual se preparó de acuerdo al manual de diagnóstico de influenza⁹, en seguida la suspensión se filtró haciéndola pasar por una gaza y con una solución de PBS frío se realizaron hasta tres lavados, se

centrifugo a 30 g durante 10 minutos a 4 °C y finalmente con el paquete de eritrocitos se preparó una suspensión al 0.5 %, la cual debe de contener aproximadamente 4×10^7 eritrocitos/mL.

Controles positivo y negativo: Se estableció como control positivo al antisuero A/California/7/2009 código 09/152 y como control negativo al antisuero B/Florida/6/2004 código 07/356, ambos del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

Estándar: Se utilizó el antisuero A/California/7/2009 H1N1 como estándar para evaluar los parámetros de desempeño del método de IHA. Este estándar se evaluó por el método de IHA y se obtuvo un título de 1280, a partir de este dato, se identificó la dilución (1:16) que al evaluarla por IHA obtuvo un título de 40. Esta dilución se eligió como la de trabajo, debido a que, en términos inmunológicos es importante que el método sea capaz de detectar el título de corte (título de IHA de 40) que predice una protección generada por infección natural².

Enzima destructora de receptores inespecíficos (RDE): Para remover los inhibidores inespecíficos de hemaglutinación, los antisueros son tratados con la enzima RDE (Denka Seiken Co., Ltd, Cat # 370013) con una relación 1:3 (v/v), esta dilución de suero-RDE se incubó a 37 °C en un baño de agua durante 18 horas; una vez transcurrido este tiempo se realizó otra incubación en baño de agua a 56 °C por 30 minutos para inactivar a la enzima. La preparación anterior que tenía una dilución 1:4 se llevó a una dilución 1:10 con PBS pH.7.2 y se almacenó entre 2 - 8 °C hasta una semana. Para verificar que los antisueros que se utilizaron en el método de IHA no presentaran aglutininas inespecíficas; en una microplaca de 96 pozos se adicionaron 50 µL de cada mezcla suero-RDE (1:10) colocando cada antisuero independiente en el primer pozo de la fila A. La columna 12 se utilizó como control de eritrocitos y se le adiciono 50 µL de PBS en cada pozo, se agregaron a las filas B, C y D 25 µL de PBS frío y se realizaron diluciones seriadas

partiendo con 25 μ L de la columna A hacia la fila B, de la B a la C y de la C a la D, descartando los últimos 25 μ L, las diluciones finales son para A 1:10, B 1:20, C 1:40 y D 1:80. A todos los pozos de la fila A hasta D que contienen dilución se les adiciona 25 μ L de PBS. Se agitó suavemente y se agregaron a todos los pozos 50 μ L de la suspensión de eritrocitos al 0.5%. La placa se incubó a temperatura ambiente (22° a 25 °C) durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo la placa se inclinó con un ángulo entre 45 a 60 grados y se esperó a que en la columna 12 cayera por gravedad el botón de eritrocitos para empezar a leer cada uno de los sueros tratados. Si a partir de la dilución 1:20 ó más se observa aglutinación en alguno de los sueros, es necesario, realizar una adsorción del suero con el paquete de eritrocitos; si la aglutinación solo se observa en la dilución 1:10 la adsorción ya no es necesaria. Este procedimiento se realizó con el fin de evitar falsos negativos en IHA.

Método de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)^{10,11,9}: En una placa de 96 pozos se agregó 25 μ L de PBS desde la fila B hasta la fila H, 50 μ L de la concentración del estándar correspondiente, controles positivo y negativo en los pozos de la fila A. Con una pipeta multicanal se realizaron diluciones seriadas base 2 transfiriendo 25 μ L de suero de la fila A a la fila B, se homogenizó y de la fila B se transfirió a la fila C y así sucesivamente hasta llegar a la fila H descartando los últimos 25 μ L. Las diluciones finales fueron para A 1:10, B 1:20, C 1:40, D 1:80, E 1:160, F 1:320, G 1:640 y H 1:1280 . A continuación se agregó 25 μ L de la preparación viral que contenía 8 UHA/50 mL a cada pozo excepto a las columnas 11 y 12. La placa se tapó y agitó suavemente para dejarse incubar a temperatura ambiente (22° a 25 °C) durante 30 minutos. Se agregó 50 μ L de PBS a las columnas 11 y 12 las cuales sirvieron como control de virus y células respectivamente. Se agregó al pozo 11 100 μ L de la preparación viral y se realizaron diluciones seriadas base 2 transfiriendo 50 μ L de A11 a B11, de B11 a C11 y así consecutivamente hasta H11

descantando los últimos 50 µL. Se adicionó 50 µL de suspensión de eritrocitos al 0.5 % en cada pozo de la placa empezando por la columna 12 (control de eritrocitos), ésta se tapó y agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente (22° a 25 °C) durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo la placa se leyó de la misma forma que en la titulación de UHA. Se consideró que una prueba de IHA fue positiva para el virus de influenza, cuando las muestras presentaron una inhibición completa y una reacción negativa cuando se observó que la aglutinación se llevó a cabo en los pozos, como se muestra en la figura 1. El título de IHA del suero es recíproco a la dilución del suero que obtuvo una inhibición de hemaglutinación completa.

Implementación del método de IHA en el LEVV: Con base en el entrenamiento de serología recibido por el Centers for Disease Control and Prevention¹⁰ (CDC), se diseñó la estrategia para implementar el método bioanalítico de inhibición de la hemaglutinación en las instalaciones del LEVV; la cual consistió en establecer el estándar para la evaluación de los parámetros de desempeño, controles positivo y negativo, producir y ajustar a 8 UHA el virus de influenza cepa A/California/7/2009 y estandarizar la suspensión de eritrocitos al 0.5 %. Cada etapa del proceso de implementación y evaluación del método de IHA, se llevó a cabo cumpliendo los principios de bioseguridad dentro de un laboratorio nivel II como: buenas prácticas de laboratorio, manejo adecuado dentro de gabinete de seguridad nivel II de muestras biológicas, cepas virales, manejo de residuos peligrosos biológicos infecciosos, adecuadas rutinas de sanitización, etc.^{9,12,13,14}

Precisión: Con este parámetro se observó el grado de concordancia relativa entre los resultados bioanalíticos independientes^{15,16,17,18,19}, obtenidos al aplicar el método bioanalítico de IHA utilizando un estándar con título de IHA de 40. Uno de los niveles de precisión es *repetibilidad*, parámetro que se realizó mediante seis ensayos independientes por un mismo analista, en el mismo laboratorio, empleando un estándar con título de

anticuerpos conocido, en un mismo día. Otro nivel de precisión es la *precisión intermedia* la cual expresa, la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método bioanalítico se realiza en diferentes días y con diferentes analistas; la cual fue evaluada al realizar tres ensayos independientes en el mismo laboratorio, con el mismo estándar y ejecutado por dos analistas, en dos días diferentes.

Exactitud: Con este parámetro se midió el grado de concordancia entre el resultado obtenido en el método bioanalítico a diferentes concentraciones del estándar, respecto a la cantidad verdadera de anticuerpos contra el virus de influenza presentes en esa muestra^{15,16,17,18,19}; para lo cual, se realizaron tres ensayos independientes con cada título de IHA del estándar conocido a 20, 40 y 80 respectivamente.

Especificidad: Para comprobar que la metodología implementada es específica^{15,16,17,18,19} a la cepa A/California/7/2009 H1N1, se realizaron tres determinaciones independientes empleando cuatro antisueros de reto diferentes. Los antisueros seleccionados fueron anti A/Brisbane/10/2009 H1N1 (código NIBSC 08/136), anti A/Perth/16/2009 H3N2 (código NIBSC 10/182), anti B/Florida/6/2004 (código NIBSC 07/356) y antisuero contra el virus de sarampión (código NIBSC 66/202), los cuales se seleccionaron con base en los virus de influenza, que se consideran tienen una mayor circulación y por lo tanto una mayor probabilidad de causar la enfermedad generando así, diferentes tipos de respuestas inmunológicas debidas a anticuerpos, adicional a estos ensayos se incluyó un antisuero contra el virus de sarampión, debido a que este virus presenta hemaglutininas en su superficie y los anticuerpos que produce son contra esta proteína. Derivado de lo anterior se observó si existía alguna respuesta de reacción cruzada entre el virus de influenza A/California/7/2009 y los diferentes tipos de anticuerpos.

Estabilidad: Debido a que en serología las muestras de sueros son utilizadas en ocasiones para diferentes estudios o simplemente para repetir algún análisis; se evaluó la

estabilidad^{16,17,18,19} a nivel de anticuerpos que tienen las muestras ante repetidos ciclos de congelación a -20 °C y descongelación pasando las muestras de -20 °C hasta 2° y 8 °C. Para evaluar este parámetro se utilizó el estándar con un título de IHA de 40 y se sometió a tres ciclos de congelación y descongelación. Cada determinación se realizó por triplicado.

Determinación del título de una muestra clínica

Una muestra clínica con título de IHA de 640 otorgada para este estudio por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) fue analizada por triplicado mediante tres ensayos independientes.

Análisis estadístico: Debido a que el método bioanalítico de IHA es cualitativo, la naturaleza de la medición es discreta, por lo que, el resultado para cada determinación de los parámetros de desempeño se estableció en términos de cumplimiento; es decir, cumple (C) o no cumple (NC), y esto a su vez se tradujo en términos numéricos $C = 1$ y $NC = 0$. Cuando un resultado se expresa como C ó 1 quiere decir que el título de anticuerpos obtenido por el método de IHA fue el esperado, ya que el título del estándar era conocido. Como el resultado obtenido es cualitativo, los resultados se expresaron en términos fracción disconforme (p). La p se calculó sumando la cantidad de resultados disconformes o que no cumplen con el resultado esperado y este se dividió entre el total de determinaciones realizadas en el ensayo.

Revisión ética

Las Comisiones de Ética, Bioseguridad e Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública aprobaron la realización de este estudio.

Resultados

Implementación del método de IHA: El resultado de las determinaciones del título para la muestra clínica indican que la metodología cumple con los criterios adecuados tanto para los controles positivo, negativo, de virus y de eritrocitos, es decir, el control positivo tuvo un título de IHA mayor a 1280, el control negativo un título de IHA menor a 5, el control de virus presento 8 UHA y en el control de células se observó el corrimiento adecuado del botón de eritrocitos. Además, se confirmó, el título de IHA de la muestra clínica que fue de 640, el cual, corresponde al título de IHA determinado por el InDRE.

Precisión

Repetibilidad: Al realizar seis determinaciones independientes con el método de IHA y utilizar un estándar con título conocido de IHA de 40; el resultado obtenido a los 30 minutos de incubación y observar hemaglutinación completa en el control de eritrocitos y muestras se determinó un título de IHA de 40, valor que se esperaba por lo tanto no hubo ningún resultado disconforme, de esta manera la fracción disconforme para este parámetro de desempeño es cero (Tabla I).

Precisión Intermedia: Los resultados para precisión intermedia se muestran en la tabla II. En este parámetro para ambos analistas la fracción disconforme fue cero.

Exactitud: En la tabla III, se muestran los resultados obtenidos en las 9 determinaciones independientes que se realizaron con el método de IHA y tres concentraciones diferentes del estándar. El resultado obtenido para el triplicado fue el mismo que el título real conocido de IHA de 20, 40 y 80 del estándar; por lo tanto, la fracción disconforme fue cero.

Especificidad: La especificidad en el método de IHA que utiliza la cepa de virus de influenza A/California/7/2009 se evaluó con diferentes antisueros y los resultados se muestran en la tabla IV. Se observa que solamente existe inhibición completa cuando el virus se reata con su antisuero homólogo ya que se obtiene un título de IHA mayor a 1280 por triplicado, por el contrario, no se observa especificidad al utilizar otros tipos de antisueros contra diferentes cepas virales como H1N1, H3N2, B y antisarampión, ya que los títulos de IHA que se obtuvieron por triplicado fueron menor a 10. No se presenta especificidad con el antisuero B/Florida/6/2004 por lo tanto, este fue establecido como control negativo en este y todos los ensayos que se realizaron con el método de IHA. Fig. 2.

Estabilidad: Después de someter a tres ciclos de congelación y descongelación el estándar y de evaluarlo con el método de IHA; el resultado demostró que la consistencia de anticuerpos en el estándar se conserva, ya que el título obtenido después de cada ciclo fue 40.

Discusión

Con la evaluación de los parámetros de desempeño se demostró la correcta Implementación del método de IHA en el Laboratorio de Evaluación de Vacunas Virales (LEVV) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Ya que el método de IHA establecido demostró ser *específico*, debido, a que no existió reacción cruzada entre la cepa de virus de influenza A/California/7/009 H1N1 con otros tipos de virus de influenza tipo A (H1N1, H3N2), B y antisarampión, es decir, la respuesta analítica del método se debió únicamente a la reacción específica entre la cepa viral y su antisuero homólogo. Al ser este parámetro tan importante, es utilizado en las pruebas de control de calidad de la vacuna de influenza para demostrar identidad y asegurar que la vacuna solo contiene el antígeno producido. También demostró ser *exacto* a los títulos de 20, 40 y 80 porque al

determinar el contenido de anticuerpos en el estándar a estas tres concentraciones con análisis independientes los resultados fueron los esperados. El método es *preciso* ya que al determinar el contenido de anticuerpos en el estándar, el método de IHA presentó repetibilidad en los resultados de seis análisis independientes que se realizaron. Los resultados para *precisión intermedia* indican que la metodología establecida no presenta variabilidad entre analistas y días. Los resultados para el parámetro de *estabilidad* muestran que hasta con tres ciclos de congelación y descongelación el contenido de anticuerpos presentes en el estándar, no se ve afectado ni disminuido, ya que el título de IHA fue el mismo para cada determinación después de cada ciclo.

A partir de la evidencia documentada de que el método de IHA fue implementado y evaluado, se concluye que puede utilizarse como método de rutina en el Laboratorio de Evaluación de Vacunas Virales del INSP y así, evaluar la eficacia en las vacunas de influenza con resultados oportunos y confiables para soportar las decisiones que contribuyan al mejoramiento de las condiciones de salud en la población mexicana

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V. (BIRMEX), al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y al Laboratorio de Evaluación de Vacunas Virales del Instituto Nacional de Salud Pública (LEVV/INSP) por haber colaborado conjunta y cordialmente en el cumplimiento de los objetivos de este estudio. El presente es en agradecimiento y en memoria del Dr. Jose Luis Valdespino Gómez, por su gran contribución al sistema de salud y académico de

México al crear e impulsar entre otras cosas la Maestría en Ciencias de la Salud con área de concentración en Vacunología.

Referencias

- ¹ Cordova-Villalobos, Valdespino- Gómez, Ponce de León-Rosales. La epidemiología de influenza A/H1N1 en México. México: Panamericana, 2010; 88-105.
- ² Noah D, Hill H, Hines D, White E and, Wolf M. Qualification of the hemagglutination inhibition assay in support of pandemic influenza vaccine licensure. Clin. Vaccine immunol. 2009; Vol. 16 No. 4: 558-566.
- ³ Arankalle V, Virkar R, Tandale B and Ingle N. Utility of pandemic H1N1 2009 influenza virus recombinant hemagglutinin protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for serosurveillance. Clin. Vaccine immunol. 2010; Vol. 17 No. 9: 1481-1483.
- ⁴ Savón-Valdés C, Goyenechea-Hernández A, Oropesa-Fernández S, Valdés-Ramírez O, Acosta-Herrera B, González-Muñoz G, *et al.* Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. OPS/WHO/UMEVyTS. 2003: 15-244.
- ⁵ Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Manual de microbiología médica. 14 ed. México: El manual moderno. 1992.
- ⁶ Palmed D, Dowdle W, Coleman M. Shild G. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Immunology series No. 6 part. 2: procedural guide US Department of Health Educat. And Public Health service. 1975: 25-62
- ⁷ Swenson PD. Hemagglutination inhibition test for the identification of influenza viruses. Clinical microbiology procedures handbook. Washington, DC: ASM, 1992:8-11.
- ⁸ OPS-CDC Protocolo genérico para la vigilancia de la influenza. PAHO/HDM/CD/V/411/06. Washington D.C. 2006: 1-47
- ⁹ WHO Global influenza surveillance network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011: 1-137.
- ¹⁰ CDC/InDRE. Serology Training: Serologic detection of human influenza virus infections by Hemagglutination-Inhibition Assay using Turkey RBCs. CDC/CCID/NCIRD/ID. SOP No. LP-003 2009. Course April 5-20,2010. México.
- ¹¹ Lennette E. Diagnosis procedures: for viral and rickettsial infections. New York: American Public Health Association, 1969:414-456.
- ¹² WHO. Laboratory biosafety manual. 3rd ed. 2004.
- ¹³ CDC. Interim biosafety guidance for all individuals handling clinical specimens or isolates containing 2009-H1N1 influenza A virus (novel H1N1), including vaccine strains. 2009. Consultado el 2011,03,15. Disponible en: [http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidelines_labworkers.htm].

¹⁴ Norma oficial mexicana NOM-087-Ecol-SSA1-2002. Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos- clasificación y especificación de manejo. 2003.

¹⁵ Secretaría de Salud. Farmacopea de los estados unidos mexicanos. México. 2008:2427-2447.

¹⁶ Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on validation of bioanalytical methods. London. 2010:1-17.

¹⁷ Stephenson I, Heath A, Major D, Newman R, Hoschler K, Junzi W, Katz J, Wood J. Reproducibility of serologic assays for influenza virus A (H5N1). Emerging infectious diseases. Vol. 15. No. 8. 2009: 1250-1259.

¹⁸ ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1). 1996.

¹⁹ FDA Guidance for industry – Analytical Procedures and Methods Validation – Draft Guidance, August 2000.

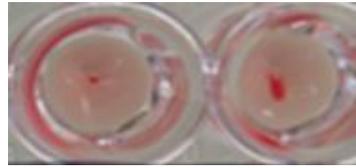
Figura 1. Interpretación del resultado de IHA en la placa

Inhibición de la hemaglutinación



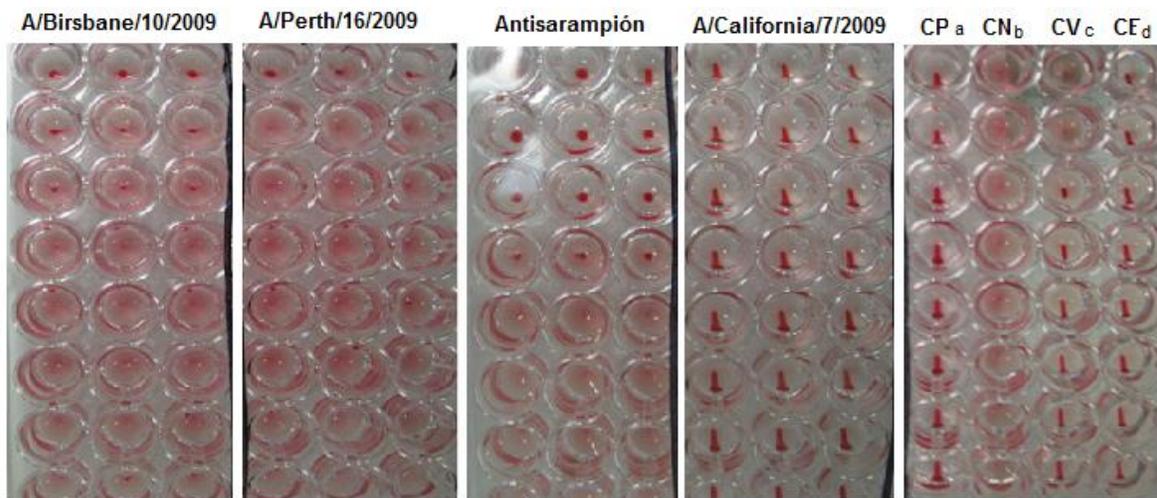
Resultado positivo

Hemaglutinación



Resultado negativo

Figura 2. Imagen del resultado obtenido de especificidad



^a Control positivo, ^b Control negativo, ^c Control de virus a 8 UHA y ^d Control de eritrocitos

Tabla I. Resultado de repetibilidad

	Determinación					
	1	2	3	4	5	6
Resultado	C	C	C	C	C	C
Asignación numérica	1	1	1	1	1	1
p	0					

Tabla II. Resultado de precisión intermedia

	Determinación					
	Día 1			Día 2		
	1	2	3	1	2	3
Resultado Analista 1	C	C	C	C	C	C
Resultado Analista 2	C	C	C	C	C	C
Asignación numérica	1	1	1	1	1	1
p	0					

Tabla III. Resultados de exactitud del método IHA

Título IHA esperado	Determinación			Valor numérico asignado			Fracción disconforme (p)
	1	2	3				
20	C	C	C	1	1	1	
20	C	C	C	1	1	1	0
20	C	C	C	1	1	1	
40	C	C	C	1	1	1	
40	C	C	C	1	1	1	0
40	C	C	C	1	1	1	
80	C	C	C	1	1	1	
80	C	C	C	1	1	1	0
80	C	C	C	1	1	1	

Tabla IV. Resultados de especificidad en el método de IHA

Antisuero Anti ^a	Título de IHA		
A/Brisbane/10/2009 H1N1	< 10	< 10	< 10
A/Perth/16/2009 H3N2	< 10	< 10	< 10
B/Florida/6/2004	< 10	< 10	< 10
Sarampión	< 10	< 10	< 10
A/California/7/2009	>1280	>1280	>1280

^a Resultado del título de IHA por triplicado