

## Obtención de un conjugado peroxidasa-antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

### Obtention of a peroxidase-hepatitis B virus surface antigen conjugate

Dra. Tammy Fernández Romero; Dr. Antonio González Griego; Ing. Antonio Melchor Rodríguez; Dr. Félix J. Fernández Acosta

---

#### RESUMEN

Se preparó un conjugado para la determinación de anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B por inmunoensayo enzimático tipo *sandwich* de doble Ag. Se utilizó la peroxidasa, el antígeno de la vacuna cubana contra la hepatitis B y el método de conjugación del periodato. Se evaluó la actividad enzimática, la actividad inmunológica y la actividad específica del conjugado. La enzima y el antígeno conservaron su actividad luego de la conjugación y se escogió la dilución óptima de trabajo 1/200. Se concluyó que el conjugado obtenido presentaba adecuada especificidad, detectabilidad y reactividad, y podía considerarse apto para su utilización.

**Palabras clave:** ELISA, evaluación de conjugados, actividad enzimática, actividad inmunológica, AgHBs, anti-HBs, hepatitis B.

---

#### SUMMARY

A conjugate was prepared for the determination of antibodies against the surface antigen of hepatitis B virus by double Ag sandwich ELISA. Peroxidase, the antigen of the Cuban vaccine against hepatitis B, and the periodate-conjugation method were used. The enzymatic activity, the immunological activity and the specific conjugate activity were evaluated. The enzyme and the antigen conserved their activity after conjugation, and the optimal working dilution 1/200 was selected. It was concluded that the conjugate obtained had an adequate specificity, detectability and reactivity, and could be considered apt for its use.

**Key words:** ELISA, conjugate evaluation, enzymatic activity, immunological activity, AgHBs, anti-HBs, hepatitis B.

---

## INTRODUCCIÓN

La hepatitis B (HB) constituye un grave problema de salud en el mundo. Se ha reportado que la quinta parte de la población mundial tiene evidencias serológicas de infección por el virus de la hepatitis B (VHB). Cada año se infectan más de 50 000 000 de personas y se producen como mínimo 250 000 casos nuevos de cáncer de hígado atribuibles a este virus. Además, se estima que 350 000 000 de personas mantienen el estado de portador del VHB.<sup>1</sup>

El diagnóstico y seguimiento de la HB requiere la determinación de marcadores serológicos virales, antígenos (Ag) y anticuerpos (Ac), mediante inmunoensayos. El Ag de superficie del VHB (AgsHB) es la principal proteína de la envoltura viral y el primer marcador serológico en aparecer, por lo cual es el más importante para el diagnóstico de la infección. Los Ac contra el AgsHB (anti-HBs) indican recuperación clínica o curación e inmunidad.<sup>2-4</sup>

Entre los inmunoensayos de tipo enzimáticos se encuentra el ELISA. La peroxidasa (POasa) y el método de conjugación del periodato ( $\text{NaIO}_4$ ) son muy utilizados para la preparación de los conjugados que se emplean en este procedimiento.<sup>5-7</sup>

Este trabajo tuvo como objetivo obtener un conjugado POasa-AgsHB para la determinación de anti-HBs por ELISA *sandwich* de doble Ag.

## MÉTODOS

### *Materiales biológicos*

POasa: P 6782, Tipo VI-A, Lote: 26H9512 (Biochemicals and Reagents for life science research. Sigma 2004-2005).

AgsHB: Ag recombinante obtenido y producido en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba, según patente *European Patent Application* EPO 480525 A2 (1992). Concentración: 1,26 mg/mL para la conjugación y 1,85 mg/mL diluido 1/1 600 como recubrimiento.

Anti-HBs: suero policlonal de burro con fraccionamiento alcohólico. Concentración 32 000 000 UI/L como control positivo diluido 1/10 000 y como recubrimiento diluido 1/20 000.

Control negativo: suero humano normal.

### *Métodos utilizados*

1. Método del  $\text{NaIO}_4$  para la conjugación de POasa<sup>8</sup> y Método de Lowry<sup>9</sup> para la determinación de la concentración de proteína específica del conjugado.

2. Métodos de evaluación del conjugado: se incorporó un algoritmo analítico de evaluación, que consiste en la determinación de la actividad enzimática sin interacción Ag-Ac (AE), seguida de la determinación de la actividad inmunológica (AI) y finalmente de la actividad específica.<sup>10,11</sup>

Para la evaluación de AE y AI se emplearon las placas de 96 pocillos, los reactivos y algunos de los pasos de los procedimientos que se siguen en los ELISA *sandwich* de doble Ag y de doble Ac para HB, producidos, desarrollados y validados en el Laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Genética Médica, en colaboración con el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.<sup>12,13</sup>

Para la AE el procedimiento consistió de forma general en añadir a la placa sin recubrir el conjugado en diluciones dobles seriadas (en solución reguladora fosfato salino, pH 7,4) y un blanco de reactivos. Luego se incubó con la solución sustrato y finalmente se midió la absorbancia del producto coloreado a 492 nm.

Para la AI el procedimiento general consistió en recubrir la placa con anti-HBs e incubar con el conjugado en diluciones dobles seriadas (en el diluyente del conjugado empleado en el ELISA *sandwich* de doble Ag). Luego se lavó la placa, se incubó con la solución sustrato y se midió la absorbancia del producto coloreado a 492 nm.

La evaluación de la actividad específica del producto como conjugado se realizó en el ELISA *sandwich* de doble Ag.<sup>13</sup> Se analizaron varias diluciones del conjugado con diluciones dobles seriadas del control positivo de anti-HBs.

### *Análisis*

Se trabajó con 3 desviaciones estándar (DE) y un coeficiente de variación (CV) de hasta 10 %, para 99,9 % de confianza. Las variables determinadas fueron: AE, AI y DT (dilución óptima de trabajo para el ELISA *sandwich* de doble Ag).

La AE y la AI se expresaron como un valor numérico según la fórmula  $A = (DO_F / DS) \times Dil$ , donde Dil es la máxima dilución del conjugado en que la media de las densidades ópticas se encontró por encima del valor límite ( $DO_F$ ), y DE es la desviación estándar del blanco de reactivos. El valor límite fue calculado como la media del blanco de reactivos más 3 desviaciones estándar.<sup>10,11</sup>

La DT para este método es la dilución del conjugado donde coinciden la mayor linealidad, la mayor capacidad de discriminación (K), y sobre todo la mayor sensibilidad (S).<sup>13</sup>

Para evaluar la precisión de los resultados de AE y AI se realizaron 2 ensayos en cada caso, con 8 repeticiones de cada dilución. Para la DT se realizaron 2 ensayos con 2 repeticiones de cada dilución.

## **RESULTADOS**

El conjugado POasa- AgsHB obtenido quedó con una concentración de Ag de 0,82 mg/mL y un volumen de 20,4 mL. En la [tabla 1](#) se observa que la AE se encontró en el orden de millones y los CV, tanto intraensayo como interensayos, estuvieron por debajo de 10 %. En la [tabla 2](#) se muestra que la AI presentó valores de algo

más de 100 000 y los CV de los estudios de precisión también fueron inferiores a 10 %.

En las tablas 3 y 4 se muestran los resultados de la evaluación del conjugado en el ELISA *sandwich*. Puede observarse que los valores de la capacidad de discriminación y el total de puntos lineales consecutivos fueron similares en las diluciones evaluadas del conjugado, pero en la 1/200 se observó la mayor sensibilidad del método. En todo el rango de diluciones evaluado los CV de los estudios de precisión se encontraron por debajo de 10 %.

## DISCUSIÓN

En la determinación de la AE, como se añade el conjugado directamente a la placa sin emplear recubrimiento, se mide la actividad tanto de la enzima marcada como de la libre, porque el conjugado no se purifica una vez obtenido. En la AI, al realizarse el lavado después de incubado el conjugado con el recubrimiento, la señal que se obtiene es solo la de la enzima marcada y de esta forma se mide indirectamente la actividad inmunológica del reactivo.<sup>10,11</sup>

La evaluación de AE y AI solo permitió conocer que existía funcionamiento de la enzima y del AgsHB luego de la conjugación. No se puede especificar cuán buena es esa actividad por no disponer de valores de referencia, porque estas evaluaciones no se hacían en el laboratorio con anterioridad a este estudio. Sin embargo, estos resultados deben ser utilizados en los estudios de estabilidad y en la evaluación de conjugados que se preparen con posterioridad. De esta forma se comenzarían a establecer los valores de referencia para el trabajo.<sup>10,11</sup>

En la evaluación en el ELISA *sandwich*, tanto la linealidad como la capacidad de discriminación del método en las diluciones analizadas fueron muy similares. Como este inmunosistema se emplea para conocer el estado inmunológico del paciente, si se encuentra seroprotegido (10-100 UI/L de anti-HBs) o es hiperrespondedor (más de 100 UI/L de anti-HBs), y su capacidad de respuesta inmune, lo más importante es la sensibilidad del método.<sup>14,15</sup> La dilución donde se observó mayor sensibilidad fue la 1/200, por lo que se escogió como la DT.

Aunque la dilución 1/200 es bastante baja, es comparable con las que se han obtenido en conjugados preparados con anterioridad en este laboratorio. A pesar de lo anterior, con el volumen final que se obtuvo (20,4 MI) se puede realizar la cuantificación de aproximadamente 2 600 muestras, lo cual representa trabajo para alrededor de 1 año.

En todas las evaluaciones los CV se encontraron por debajo de 10 %. Esto indica que la precisión de los resultados fue buena al encontrarse estos valores dentro de los criterios escogidos para 99,9 % de confianza.

Se concluyó que el conjugado de POasa- AgsHB obtenido por el método del periodato, presenta adecuada especificidad, detectabilidad y reactividad, y puede considerarse apto para su utilización en la determinación de anti-HBs por ELISA *sandwich* de doble Ag.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santiesteban Torres JA, Alerm González A, González Griego A. Evaluación bioquímico-inmunológica de infectados crónicos por el virus de la hepatitis B. Comportamiento de la respuesta inmune en sus contactos familiares. Rev Cubana Invest Biomed 2000; 19(1). Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/>
2. Rodríguez Acosta C. Actualización sobre hepatitis viral: citología, patogenia, diagnóstico microbiológico y prevención. Rev Cubana Med Gen Integr 2000; 16(6): 547-85.
3. Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6<sup>th</sup> ed. Washington: ASM Press; 2002.
4. Robbins Stanley L, Cotran R, Kumar V, Collins T. Patología Estructural y Funcional. 6<sup>a</sup> ed. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana; 2000.
5. Del Pilar Crespo M. El diagnóstico viral por el laboratorio. Colombia Médica 2000; 31: 135-50.
6. Reina M. ELISA. [en línea] 2003 [fecha de acceso enero de 2005]. Disponible en: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm>
7. La Técnica ELISA. [en línea] 2003 [fecha de acceso mayo 4 del 2003]. Disponible en: <http://www.labgeminis.com/disclaimer.htm>
8. Tijssen P. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, practice and theory of enzyme immunoassays Vol 15. London: Elsevier Science Publishers; 1985.
9. Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 139: 265-75.
10. Fernández Romero T, González Griego AM, Fernández Acosta FJ, González Ramírez VE. Propuesta de la actividad enzimática como procedimiento analítico rector en la evaluación de conjugados. Rev Cubana Invest Biomed 2006; 25(3). Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/>
11. Fernández Romero T, González Griego AM, Fernández Acosta FJ, González Ramírez VE. Propuesta de metodología analítica para la evaluación de conjugados inmunoenzimáticos. Rev Cubana Invest Biomed 2007; 26(1). Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/>
12. González Griego A, Alerm A, Vega García I, Ramírez Albajés V. Quantification of the surface antigen of HBV (HBsAg) in biological samples for health care and preparative purposes. Biotecnol Aplicada 1993; 10: 17-7.
13. Ramírez Albajés V, González Griego A, Alerm A, Izquierdo M. Immunoenzimatic method for the quantification of anti-HBs. Biotecnol Aplicada 1993; 10: 17-6.
14. Ramírez Albajés V, González Griego A, Alerm A, Vega García I, Pentón Arias E, González Griego M. Seguridad e inmunogenicidad de la vacuna cubana Heberbiovac HB en poblaciones de América, Europa, África y Asia. Rev Cubana Invest Biomed 2000; 19(1): 27-33. Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/>
15. Zumaeta Villena E, González Griego A, Ramírez Albajés V, Figueroa Barrios R. Inmunogenicidad de la vacuna recombinante cubana contra la hepatitis B en

trabajadores de la salud peruanos. Rev Cubana Invest Biomed 2000;19(1):44-50.  
Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/>

Recibido: 14 de junio de 2007.  
Aprobado: 30 de junio de 2007.

Dra. *Tammy Fernández Romero* Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Calle 146 No. 3102 esquina Ave. 31. Cubanacán, municipio Playa. Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: 208-48-77. Correo electrónico: [geoffrey@infomed.sld.cu](mailto:geoffrey@infomed.sld.cu)  
Centro Nacional de Genética Médica  
Centro de Inmunoensayos