

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

Obtention of a peroxidase-anti-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 y evaluó un conjugado para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B por inmunoensayo enzimático tipo *sandwich* de doble anticuerpo. Se utilizaron anticuerpos policlonales de burro contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, la peroxidasa y el método de conjugación del periodato. Se evaluó la actividad enzimática, la actividad inmunológica y la actividad específica del conjugado. La enzima y los anticuerpos conservaron su actividad luego de la conjugación y se escogió el rango de diluciones 1/400-1/1 400 como óptimo para el trabajo. 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 and evaluated for the detection of hepatitis B virus surface antigen by double antibody sandwich ELISA. Donkey polyclonal antibodies against the hepatitis B virus surface antigen, peroxidase and the periodate conjugation method were used. The enzymatic, immunological and specific activity of the conjugate were evaluated. The enzyme and the antibodies conserved their activity after conjugation, and the dilution range 1/400-1/1400 was chosen as optimal for the work. It was concluded that the conjugate obtained presented an adequate specificity, detectability and reactivity, and that it could be considered apt

for its use.

Key words: ELISA, conjugate evaluation, enzymatic activity, immunological activity, AgHBs, anti-Hbs, hepatitis.

INTRODUCCIÓN

La hepatitis B (HB) es una de las hepatitis virales más estudiadas. Esta enfermedad constituye un importante problema de salud pública al nivel mundial, debido al elevado número de portadores crónicos que existe (alrededor de 350 000 000) y por presentar formas clínicas graves, evolucionar a la cronicidad y llevar a complicaciones que incluyen la muerte; al virus de la HB (VHB) se le atribuyen 1 000 000 de muertes al año por enfermedad hepática y carcinoma hepatocelular.¹⁻³

La determinación de marcadores serológicos virales por inmunoensayos como los ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) permite identificar la infección por el VHB. Entre estos marcadores, el antígeno de superficie (AgSHB) es el primero en aparecer y el más importante para el diagnóstico.⁴⁻⁶

El ELISA es un inmunoensayo enzimático en el que se emplean conjugados de enzimas con anticuerpos (Ac), antígenos (Ag) o haptenos. La peroxidasa (POasa) y el método de conjugación del periodato (NaIO₄) son muy populares en la preparación de estos reactivos.⁷⁻⁹

Este trabajo tuvo como objetivos obtener un conjugado de POasa con Ac contra el AgSHB (anti-HBs) y evaluar su utilidad en la determinación del AgSHB por ELISA *sandwich* de doble Ac.

MÉTODOS

Materiales biológicos

- POasa: P 6782, Tipo VI-A, Lote: 26H9512 (Biochemicals and Reagents for life science research. Sigma 2004-2005).
- anti-HBs: suero policlonal de burro con fraccionamiento alcohólico. Concentración 32 000 000 UI/L para conjugar y como recubrimiento diluido 1/20 000.
- AgSHB: Ag recombinante, expresado en la levadura *Pichia pastoris* y purificado. Obtenido y producido en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba, según patente: *European Patent Application* EPO 480525 A2 (1992). Concentración 1,85 mg/mL diluido 1/100 000 como control positivo, y 1,26 mg/mL diluido 1/1 100 como recubrimiento.
- Control negativo: suero humano normal.

Métodos utilizados

1. Método del NaIO_4 para la conjugación de POasa¹⁰ y método de Lowry¹¹ para la determinación de la concentración de proteína específica del conjugado.
2. Métodos para la 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.^{12,13}

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 Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", en colaboración con el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.^{14,15}

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 a 492 nm.

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

La evaluación de la actividad específica del producto como conjugado se realizó en el ELISA *sandwich* de doble Ac.¹⁴ Se analizaron varias diluciones del conjugado, cada una con diluciones dobles seriadas del control positivo de AgsHB.

Análisis de los resultados

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 Ac).

La AE y la AI se expresaron como un valor numérico según la fórmula $A = (\text{DO}_F / \text{DE}) \times \text{Dil}$, donde Dil es la máxima dilución del conjugado, en la cual 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.^{12,13}

La DT en el ELISA *sandwich* de doble Ac correspondió con la dilución del conjugado donde coincidieron la mayor linealidad y capacidad de discriminación (K) del método.¹⁴

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- anti-HBs obtenido quedó a una concentración de Ac de 2,3 mg/mL y un volumen de 6,19 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 cientos de miles 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 la K y el total de puntos lineales consecutivos fueron superiores en el rango de diluciones entre 1/400 y 1/1 400. En todo el rango de diluciones evaluado los CV de los estudios de precisión se encontraron por debajo de 10 %.

DISCUSIÓN

Como el conjugado no se purifica una vez obtenido y en la AE este se añade directamente a la placa sin recubrir, se mide la actividad tanto de la enzima marcada como de la libre. En la determinación de la AI se realiza un lavado después de incubado el conjugado con el recubrimiento, por tanto, la señal que se obtiene es solo la de la enzima marcada y de esta forma indirectamente se mide la actividad inmunológica del reactivo.^{12,13}

La evaluación de AE y AI permitieron conocer que existía funcionamiento de la enzima y del Ac conjugados. Al no realizarse estas evaluaciones con anterioridad en el laboratorio, no existían valores de referencia para considerar estas actividades adecuadas. 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.^{12,13}

En el ELISA *sandwich* de doble Ac, para cada dilución del conjugado entre 1/400 y 1/1 400 existieron 3 puntos lineales consecutivos, no afectados en el sentido de las diluciones del control positivo. Además, aunque en ese rango existía tendencia a la disminución de los valores de K con el aumento de la dilución del conjugado, el CV entre esos valores fue menor que 10 %. De aquí que fue el rango completo el escogido como óptimo de trabajo (DT).

El empleo de una u otra dilución del conjugado dependerá de la necesidad en cada momento. Como la mayoría de las muestras que se analizan en este laboratorio son de pacientes ya diagnosticados y en muchos casos conocidos, el ELISA *sandwich* de doble Ac se utiliza fundamentalmente para cuantificar el AgsHB. En estos casos se podría emplear la dilución 1/1 400, lo cual implica además menor gasto de reactivo. En las muestras para diagnóstico de la enfermedad, o en pacientes en los que realizarles nuevas extracciones de sangre es un proceder muy invasivo, como los niños pequeños, se podría utilizar la dilución 1/400 que es donde existe mayor K.

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.

Algo importante en este estudio ha sido la alta calidad del conjugado. El fraccionamiento alcohólico, al cual fueron sometidos los Ac empleados para conjugar, es un método de bajo poder resolutivo y muy riesgoso para la estabilidad de las proteínas.^{10,16} Por tal motivo, es interesante el hecho de que se obtuviera un conjugado con una calidad comparable con la de los que se preparan con Ac más puros, como los obtenidos por cromatografía de afinidad.¹⁶⁻¹⁸ Esta elevada calidad

podría haber sido causada por la alta concentración de anti-HBs del antisero empleado (32 000 000 UI/L).

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

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 Bioméd 2000;19(1). Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/>
2. González Ramírez VE, González Griego A, Ramírez Albajés V, Alerm González A. Inmunogenicidad de la vacuna cubana recombinante heberbiovac HB en modelos experimentales y aplicados al humano. Rev Cubana Invest Bioméd 2000;19(1). Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/>
3. Rodríguez Acosta C. Actualización sobre hepatitis viral: citología, patogenia, diagnóstico microbiológico y prevención. Rev Cubana Med Gen Integr 2000;16(6):547-85.
4. Roca Goderich R, Smith Smith VV, Paz Presilla E, Losada Gómez J, Seonet Rodríguez B, Llamas Sierra N, et al. Temas de Medicina Interna Vol III. 4ª ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2002.
5. Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th ed. Washington: ASM Press; 2002.
6. Robbins Stanley L, Cotran R, Kumar V, Collins T. Patología Estructural y Funcional. 6ª ed. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana; 2000.
7. Del Pilar Crespo M. El diagnóstico viral por el laboratorio. Colombia Médica 2000;31:135-50.
8. Reina M. ELISA. [en línea] 2003 [fecha de acceso enero del 2005]. Disponible en: <http://www.ub.es/biociel/wbc/tecnicas/elisa.htm>
9. La Técnica ELISA. [en línea] 2003 [fecha de acceso mayo 4 del 2003]. Disponible en: <http://www.labgeminis.com/disclaimer.htm>
10. Tijssen P. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, practice and theory of enzyme immunoassays. Vol 15. London: Elsevier Science Publishers; 1985.
11. Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;139:265-75.
12. 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/>

13. Fernández Romero T, González Griego A. M, Fernández Acosta F. J, González Ramírez V. E. Propuesta de metodología analítica para la evaluación de conjugados inmunoenzimáticos. Rev Cubana Invest Biomed 2007;26(1). Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/>

14. 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.

15. Ramírez Albajés V, González Griego A, Alerm A, Izquierdo M. Immunoenzimatic method for the quantification of anti-HBs. Biotecnol Aplicada. 1993;10:17-6.

16. Diamandis EP, Christopoulos T. Immunoassay. New York: Academic Press; 1996.

17. Merlín Linares JC, Villaescusa Blanco R, Gerreiro Hernández AM, González González JM, González Sanpedro R, Arce Hernández AA. Preparación de un conjugado anti IgG de ratón-peroxidasa en cabra. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1999;15(2):132-6.

18. Merlín Linares JC, Villaescusa Blanco R, Gerreiro Hernández AM, González González JM, Arce Hernández AA. Preparación de un conjugado peroxidasa- anti IgG humana (cadena) en conejo. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2001;17(2):132-7.

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
Centro Nacional de Genética Médica
Centro de Inmunoensayos

Tabla 1. Evaluación de la actividad enzimática (AE) del conjugado POasa- anti-HBs

	Repetibilidad		Reproducibilidad
	Ensayo 1 (n=8)	Ensayo 2 (n=8)	
XB	0,096	0,114	0,105
DE	0,007	0,006	0,006
DO _F	0,137	0,193	
Dil	1 / 20 480 000	1 / 2 048 000	
CV %	7,3	5,3	5,7
AE	40 228571	65 945600	

XB: media de las densidades ópticas del blanco de reactivos, DE: desviación estándar del blanco de reactivos, DO_F: media de las densidades ópticas de la máxima dilución del conjugado (Dil) por encima del valor límite, CV: coeficiente de variación, AE: actividad enzimática del conjugado.

Tabla 2 Evaluación de la actividad inmunológica (AI) del conjugado POasa- anti-HBs

	Repetibilidad		Reproducibilidad
	Ensayo 1 (n= 8)	Ensayo 2 (n= 8)	
XB	0,089	0,097	0,093
DE	0,008	0,006	0,007
DO _F	0,182	0,170	
Dil	1/10 240	1/10 240	
CV %	9	6,2	7,5
AI	232 960	290 133	

XB: media de las densidades ópticas del blanco de reactivos, DE: desviación estándar del blanco de reactivos, DO_F: media de las densidades ópticas de la máxima dilución del conjugado (Dil) por encima del valor límite, CV: coeficiente de variación, AI: actividad inmunológica del conjugado.

Tabla 3. Evaluación del conjugado POasa-anti-HBs en el ELISA *sandwich* de doble Ac

Diluciones del conjugado	Repetibilidad n=2				
	XC ⁻	DE	CV (%)	X K	PL
1/100	0,208	0,015	7,2	5,9	2
1/200	0,157	0,007	4,5	2,9	1
1/400	0,132	0,007	5,3	6,1	3
1/600	0,127	0,008	6,3	5,7	3
1/800	0,124	0,007	5,6	5,8	3
1/1 000	0,122	0,004	3,3	5,6	3
1/1 200	0,106	0,003	2,8	5,1	3
1/1 400	0,116	0,008	6,9	4,3	3
1/1 600	0,111	0,008	7,2	3,4	2
1/1 800	0,118	0,007	5,9	3,8	1

XC⁻: media de las densidades ópticas del control negativo, DE: desviación estándar del control negativo, CV: coeficiente de variación, XK: media de las capacidades de discriminación del método, PL: total de puntos lineales consecutivos.

Tabla 4. Reproducibilidad de la evaluación del conjugado POasa- anti-HBs en el ELISA *sandwich* de doble Ac

Diluciones del conjugado	Reproducibilidad n=2		
	XC ⁻	DE	CV (%)
1/400	0,135	0,003	2,2
1/600	0,126	0,001	0,8
1/800	0,119	0,005	4,2
1/1 000	0,115	0,007	6,1
1/1 200	0,106	0,001	0,9
1/1 400	0,111	0,006	5,4

XC⁻: media de las densidades ópticas del control negativo, DE: desviación estándar del control negativo, CV: coeficiente de variación.