

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES DEL SIDA (LISIDA)

Evaluación de la inmovilización de un péptido de gp36 de VIH-2 en membranas de nitrocelulosa

Dervel Felipe Díaz Herrera,¹ Otto Cruz Sui,² Lucy Montano Tamayo,³ Eladio Silva Cabrera⁴

RESUMEN

Introducción: la inmovilización de antígenos a soportes sólidos se utiliza para el desarrollo de diversos inmunoensayos. Una de las primeras tecnologías desarrolladas fue la adsorción de proteínas por aplicación directa sobre la nitrocelulosa. **Objetivo:** normalizar la inmovilización de un péptido sintético de la proteína de transmembrana gp36 del VIH-2, a un soporte de nitrocelulosa para fines diagnósticos y evaluar los parámetros de desempeño en un grupo de muestras de sueros con reactividad de interés conocida. **Métodos:** el péptido se inmovilizó de forma libre, conjugado a la albúmina de suero bovina (BSA) y a la hemocianina de lapa marina (KLH) como proteínas portadoras. Se analizaron los parámetros de inmovilización y se determinó la variante óptima. Con la variante escogida se evaluó la sensibilidad y especificidad diagnóstica frente a paneles de referencia del Laboratorio de Investigaciones del SIDA. La especificidad analítica se evaluó con muestras reactivas a VIH-1 y HTLV-I. **Resultados:** el análisis de las variantes de péptido inmovilizadas a las membranas de nitrocelulosa, demostró que el péptido gp36-BSA, fue el que logró la mayor diferenciación entre muestras positivas y negativas. Se obtuvo 100 % de sensibilidad y 95,2 % de especificidad diagnóstica, así como 100 % de especificidad analítica. **Conclusiones:** el péptido gp36-BSA inmovilizado en membranas de nitrocelulosa es eficaz en el diagnóstico serológico del VIH-2, lo cual permitirá considerarlo para su empleo con fines diagnósticos en sistemas que utilicen como fase sólida la nitrocelulosa.

Palabras clave: conjugación, péptido gp 36, VIH-2, nitrocelulosa.

INTRODUCCIÓN

La inmovilización de antígenos a soportes sólidos se utiliza para el desarrollo de diversos inmunoensayos. Una de las primeras tecnologías desarrolladas fue la adsorción de proteínas por aplicación directa sobre la nitrocelulosa. Las variantes optimizadas de esta metodología, constituyen una excelente alternativa que supera a los inmunoensayos convencionales como el ELISA en diversos aspectos. Una de ellas emplea un equipo de filtración con el cual se logra una mayor uniformidad en la zona donde se aplica la muestra y se

favorece su inmovilización a la nitrocelulosa.¹ Otra tecnología empleada es el inmunoensayo en línea en la que el antígeno se aplica en forma continua sobre la membrana de manera simple, económica y permite fijar antígenos de distinta naturaleza sobre un mismo soporte.²

Paralelamente, se han desarrollado novedosas metodologías de obtención de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, que aventajan a los antígenos naturales, los cuales se emplean en los diagnosticadores, por la forma de obtención, el costo y la eliminación de la contaminación debida a los detritos celulares de las fuentes naturales;

¹ Licenciado en Bioquímica. Máster en Ciencias Bioquímicas. Investigador. Agregado. Laboratorio de Investigaciones del sida (LISIDA). La Habana, Cuba.

² Licenciado en Biología. Doctor en Ciencias. Investigador Auxiliar. LISIDA. La Habana, Cuba.

³ Técnico Medio en Química. LISIDA. La Habana, Cuba.

⁴ Especialista de II Grado en Microbiología. Doctor en Ciencias. Investigador Titular. LISIDA. La Habana, Cuba.

esto ha derivado en un mejoramiento de los parámetros de sensibilidad y especificidad de los ensayos.³⁻⁵ Es por ello que en la actualidad numerosos inmunoensayos, incorporan péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos contra los virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2 (VIH-1/2). Estos péptidos representan secuencias de la proteína que constituyen zonas altamente conservadas, las cuales permiten detectar la respuesta de anticuerpos en todos los individuos infectados y durante todos los estadios de la enfermedad, independientemente del subtipo de VIH.^{4,5} Se plantea que péptidos menores de 20 residuos de aminoácidos se unen débilmente a los soportes sólidos por lo que generalmente se conjugan a proteínas portadoras o se le añaden residuos de lisina en los grupos amino terminales, que mejoran la expresión y exposición de los epítopes y una óptima adsorción al soporte.⁶⁻⁸ Las proteínas portadoras más usadas son la albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina (OVA) y la hemocianina de la lapa marina (KLH). La BSA y la OVA se emplean en la producción de antígenos para inmunoensayos.^{6,9} La KLH, aunque la mayoría de los reportes refieren su uso en la producción de inmunógenos,^{6,7,9} también puede emplearse en la producción de antígenos para inmunoensayos.¹⁰

El presente trabajo tiene como objetivo, normalizar la inmovilización de un péptido de la proteína de transmembrana gp36 del VIH-2, de forma libre y conjugado a proteínas portadoras, sobre un soporte de nitrocelulosa, así como evaluar su desempeño en un grupo de muestras de sueros con reactividad conocida.

MÉTODOS

ANTÍGENO Y FASE SÓLIDA

Se empleó un péptido de 20 aminoácidos correspondiente a un fragmento de la glicoproteína de 36 kd (gp36) del VIH-2, sintetizado en el Centro de Inmunoensayos por el método boc.³ El péptido se conjugó a la BSA (Sigma–Aldrich) y a la KLH (Sigma–Aldrich), por el método de la carbodiimida soluble, [1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide] EDAC en una proporción 1:1.¹¹ Se emplearon membranas

de nitrocelulosa con poro de 0,2 μm (BioRad Laboratories, CA, USA) con un tamaño de 10,5 \times 15 cm.

Inmovilización del péptido a membranas de nitrocelulosa

El péptido se inmovilizó en 3 variantes: en forma libre, péptido-KLH y péptido-BSA. Se empleó un dispositivo para inmovilizar antígenos en forma de línea, cuyo principio se basó en la absorción al vacío del material biológico en una concentración determinada. Se prepararon concentraciones del péptido en un rango de 3,125 a 300 mg/mL en 2 soluciones: bicarbonato de sodio 0,1 M pH 9,6 y Tris 0,4 M-metanol 20 %. Se aplicaron 2 y 3 mL de cada variante por ranura (15,0 \times 0,3 cm). Se ensayaron los tiempos de absorción al vacío de 30 s, 1, 2 y 3 min. Una vez inmovilizados los péptidos en la nitrocelulosa, se secaron en incubadora a 37 °C durante 30 min, 1, 2, 3 h y toda la noche. Posteriormente se tiñeron con una solución de 0,1 % de rojo ponceau en ácido acético 5 %, para comprobar la homogeneidad de las bandas fijadas. Se lavaron con agua destilada, se secaron con papel de filtro, se cortaron en tiras y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización. Para la optimización de los parámetros antes señalados se emplearon 2 sueros, 1 positivo a VIH-2 y 1 negativo.

Se determinaron los parámetros óptimos de concentración, volumen, tiempo de absorción y secado, para la variante que reveló un mayor contraste de la señal positivo/negativo.

REVELADO INMUNOLÓGICO

Las tiras se incubaron independientemente con 2 mL de solución de lavado (0,02 mol/L de Na_2HPO_4 ; 0,02 mol/L de NaH_2PO_4 ; 0,015 mol/L NaCl ; 0,001 % de tiomersal y 0,3 % de Tween 20; pH 7,2-7,4) durante 15 min a temperatura de laboratorio (25 °C). Después de aspirar el contenido, se añadieron 2 mL de tampón de dilución de la muestra (0,02 mol/L de Tris; 0,1 mol/L de NaCl , 0,005 % de tiomersal y 10 % de suero normal de carnero) y reactivo bloqueador (leche en polvo descremada al 5 %). A continuación se diluyeron 20 μL de las muestras de suero (1:100) y se incu-

baron toda la noche a una temperatura de 25 °C en agitación lenta. Al transcurrir entre 16 a 20 h, se aspiró el contenido de las bandejas y se lavaron las tiras con solución de lavado durante 5 min. Esta operación se realizó hasta completar un total de 3 lavados. Posteriormente se añadieron 2 mL del tampón de dilución de la muestra con conjugado (IgG de carnero anti Fc humana conjugada a peroxidasa de rábano picante) diluido 1:1 000 y se incubó durante una hora a 25 °C en agitación. Después de 3 lavados de 5 min cada uno, se añadieron 2 mL/canal de solución reveladora lista para el uso (0,02 mol/L de Na_2HPO_4 ; 0,02 mol/L de NaH_2PO_4 ; 0,015 mol/L de NaCl y peróxido de hidrógeno 0,08 %; pH 7,2-7,4) más 1 mg de diaminobenzidina tetrahidroclicórica (DAB). Se incubó en la oscuridad hasta la aparición de un precipitado insoluble en forma de bandas de color carmelita que se deposita sobre las tiras de nitrocelulosa, después se enjuagó 2 veces con agua destilada para detener el desarrollo del color.

EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL PÉPTIDO EN MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

Con la variante escogida se evaluó el desempeño frente a paneles de referencia caracterizados en el Laboratorio de Investigaciones del SIDA. El estudio de sensibilidad del péptido gp36 se realizó con un panel de 14 muestras de suero humano positivas a VIH-2, todas caracterizadas por un *western blot* para VIH-2, New LAV BLOT II (Diagnostic Pasteur, Francia). Para el estudio de especificidad diagnóstica se emplearon 220 muestras negativas a VIH-1/2 procedentes de bancos de sangre y caracterizadas por UMELISA HIV 1+2 recombinant (TECNOSUMA, La Habana, Cuba). Para la especificidad analítica se ensayaron 60 muestras positivas a VIH-1 y 9 muestras positivas a HTLV-1. Se consideraron reactivos al péptido los sueros que revelaron una señal de intensidad superior o similar a la que mostró el suero control positivo de VIH-2.

RESULTADOS

La solución de sensibilización con mejores resultados, en todas las variantes evaluadas, fue la de Tris 0,4 M-metanol 20 %, porque se observó

una mejor discriminación entre la reactividad del suero positivo contra VIH-2 y el suero negativo.

En las 3 variantes analizadas (péptido libre, conjugado a KLH y BSA), se observó que la mejor diferenciación en la señal entre positivo y negativo se obtuvo al minuto de absorción al vacío. Por encima de este tiempo, aunque hubo un incremento en la señal frente al suero positivo, también se reveló señal en el negativo, lo que indicó una reactividad inespecífica. El tiempo de secado de las membranas a 37 °C no mostró diferencias en la señal positivo/negativo entre 30 min y toda la noche, por lo que se escogió el que brindó el mismo resultado en menor tiempo.

El revelado inmunológico de las tiras de las 3 variantes de péptido inmovilizadas, en los parámetros de concentración, volumen, tiempo de adsorción y secado analizados, mostró que todas fueron capaces de discriminar entre el suero positivo contra VIH-2 y el suero negativo; sin embargo, la variante con la señal de mayor diferencia positivo/negativo, se evidenció con el péptido gp36 conjugado a BSA en una concentración de 10 µg/mL, un volumen de 2 mL, un tiempo de absorción al vacío de 1 min y 30 min de secado a 37 °C (Fig. 1). Las variantes del péptido libre y péptido-KLH mostraron una señal más débil frente al suero positivo en todas las condiciones evaluadas.

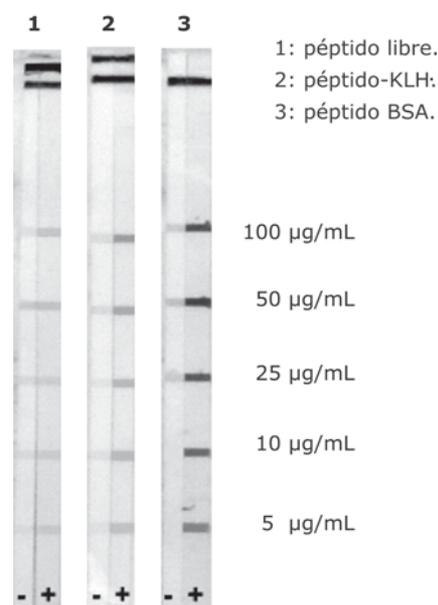
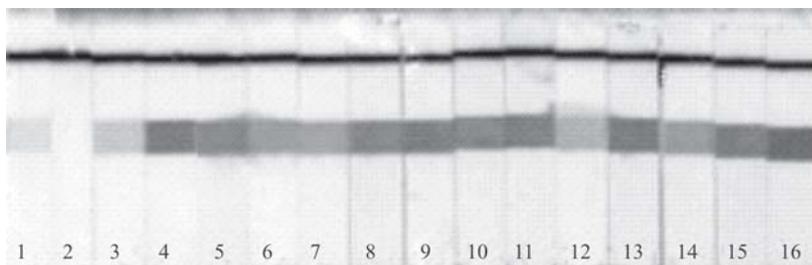
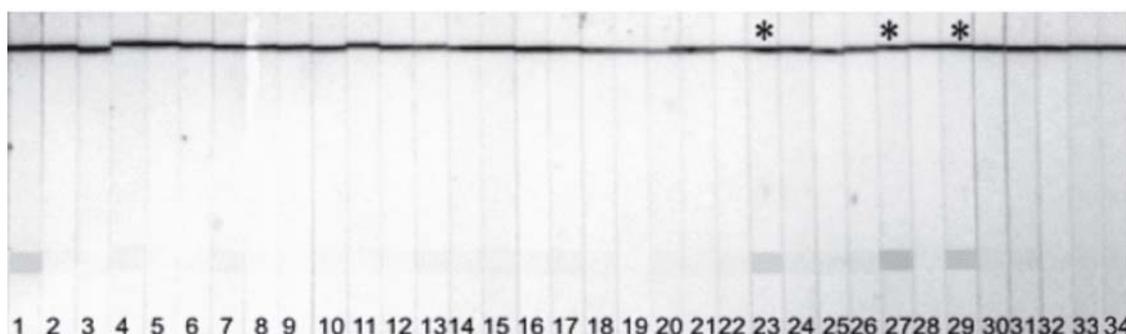


Fig. 1. Resultado del revelado de tiras sensibilizadas con los parámetros optimizados.



Tira 1: control positivo.
Tira 2: control negativo.
Tiras 3-16: muestras del panel.

Fig. 2. Resultados de la evaluación del péptido gp36-BSA frente al panel de sueros positivos VIH 2.



Tira 1: control positivo.
Tira 2: control negativo.
Tiras 3-34: sueros negativos.

* Sueros negativos con reactividad al péptido gp36-BSA.

Fig. 3. Resultados de la evaluación de tiras sensibilizadas con péptido gp36-BSA frente a muestras de sueros negativos a VIH 1/2.

En la evaluación del desempeño realizada al péptido gp36-BSA inmovilizado en la membrana de nitrocelulosa, todas las muestras positivas a VIH-2 mostraron reactividad al péptido (Fig. 2), para una sensibilidad diagnóstica de 100 %. De los 220 sueros negativos a VIH1/2, 11 mostraron una reactividad similar al control VIH-2, para una especificidad diagnóstica de 95,2 %. En la figura 3 se muestran los resultados frente a 32 sueros negativos donde se observan 3 de los sueros que revelaron una reactividad muy débil contra la banda de péptido (tiras 23, 27 y 29). En el análisis de los 60 sueros positivos a VIH-1 y los 9 positivos a HTLV-I, no se observó reactividad frente al péptido, para 100 % de especificidad analítica (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

El resultado obtenido con la solución de tris-metanol pudo ser consecuencia de una mayor

activación de los grupos hidrofóbicos de la nitrocelulosa favorecida por el uso del metanol y el incremento de las interacciones entre estos grupos. La solución de bicarbonato de sodio 0,1 M pH 9.6 fue menos eficaz, porque se obtuvo una señal menos intensa en todas las variantes analizadas. Este resultado difiere con otros autores que utilizan esta solución en la sensibilización de la fase sólida de los ELISA¹² y en sistemas con soporte de nitrocelulosa.^{13,14}

El resultado alcanzado con el péptido gp36-BSA coincidió con lo expresado por otros autores que emplearon esta proteína portadora en la producción de antígenos para inmunoensayos, los cuales plantearon que la BSA es la más utilizada en la conjugación de péptidos, porque permite una mejor orientación y exposición de los epítopes, así como una mejor adsorción al soporte sólido, con lo que se mejora la sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos que utilizan péptidos sintéticos en la fase sólida.^{6,7,9,15} Singh y otros en 2007 demostraron que la conjugación de un péptido de la

proteína de 24 Kd (p24) del VIH-1 a BSA y el empleo de un brazo espaciador, incrementaron la sensibilidad y especificidad respecto al péptido libre, en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos anti p24.⁹ De igual forma, Casey y otros en 2006 estudiaron antígenos para el diagnóstico de la infección por el virus de Epstein-Barr comparando péptidos libres y conjugados a BSA y obtuvieron con la conjugación un incremento de 71 a 92 % en la sensibilidad del ensayo.¹⁵

En el caso de la disminución de la señal del péptido libre con respecto al conjugado a BSA coincidió con lo reportado en la literatura, donde se plantea que péptidos de bajo peso molecular se unen débilmente a los soportes sólidos o tienden a formar agregados que impiden una adecuada exposición de sus determinantes antigénicos y de esta manera se dificulta su reconocimiento por los anticuerpos de una muestra positiva. Por esta razón generalmente se conjugan a proteínas portadoras o se le adicionan residuos terminales de lisina al amino terminal, para aumentar la expresión y exposición de sus epítopes antigénicos y una mejor adsorción al soporte sólido.^{4,6-8}

Es interesante que otros autores empleen péptidos de 20 aminoácidos sin conjuguar o menos, en sistemas inmunoenzimáticos tipo ELISA que difieren en la naturaleza del soporte utilizado en el presente trabajo.^{12,16}

Al parecer, la conjugación del péptido a proteínas portadoras no depende solo del tamaño del péptido sino además de la naturaleza del soporte, la forma de inmovilización y del medio donde ocurre la reacción inmunoenzimática.

Para el péptido-KLH este resultado puede indicar deficiencias en el proceso de conjugación, debido a una menor cantidad de péptido unido, comparada con el péptido-BSA. Carter, en 1994,⁶ planteó que en ocasiones, las conjugaciones con KLH necesitan la reducción de la proteína a través de la ruptura de los puentes disulfuro, lo cual incrementa la exposición de una mayor cantidad de grupos reactivos, que en la estructura nativa no son accesibles para las moléculas de péptido.

Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos, son semejantes a los de otras evaluaciones realizadas con diagnosticadores comerciales que emplean antígenos sintéticos de gp36 para la detección de anticuerpos contra VIH-2.¹⁶⁻¹⁹

Krutzik y otros en 1996 al desarrollar el sistema UniGold HIV-1/HIV-2 emplearon péptidos de VIH-1 y VIH-2 conjugados a BSA, con resultados de especificidad y sensibilidad de 99,8 y 100 %, respectivamente.²⁰ Kline y otros en 1996 normalizaron y evaluaron un sistema discriminatorio para VIH-1/2 empleando 215 muestras de suero positivas a VIH-2 y 548 sueros negativos; obtuvieron 100 % de sensibilidad y 95,4 % de especificidad.¹⁷ Martín y otros en 2007, en el desarrollo de un ELISA heterogéneo indirecto, para el pesquaje de anticuerpos al VIH-2, utilizaron la misma secuencia peptídica que la empleada en este trabajo,¹² pero sin conjuguar a BSA. La evaluación de este sistema con paneles de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) mostró 100 % de sensibilidad y 99,81 % de especificidad, lo que demuestra la eficacia de esta secuencia peptídica como antígeno para inmunoensayos.

Los resultados anteriores demostraron que el péptido gp36-BSA inmovilizado en membranas de nitrocelulosa es efectivo en el diagnóstico serológico del VIH-2 y, por tanto, pudiera emplearse con fines diagnósticos en sistemas que utilizan como fase sólida la nitrocelulosa, como son los inmunoensayos en líneas y el *western blot*. En este último, su incorporación a un sistema para la confirmación de la infección por el VIH 1, pudiera aumentar la capacidad diagnóstica y al mismo tiempo realizar un diagnóstico simultáneo y discriminatorio de ambos virus.

Evaluation of the immobilization of one HIV-2 gp36 peptide in nitrocellulose membrane

ABSTRACT

Introduction: antigen immobilization in solid supports is used for the development of several immunoassays. One of the first technologies developed was the protein adsorption by direct application to nitrocellulose. **Objective:** to standardize the immobilization of a synthetic peptide of the HIV-2 transmembrane protein gp36 to nitrocellulose support for diagnostic purposes and to evaluate the performance parameters in a group of serum samples with recognized interesting reactivity. **Methods:** the peptide was freely immobilized, conjugated to bovine serum albumin (BSA) and to keyhole limpet hemocyanin (KLH) as carrier proteins. Immobilization parameters were analyzed and then, the optimal immobilization alternative was determined. Using the chosen variant, the diagnostic sensitivity and specificity against reference panels of the AIDS Research Laboratory were evaluated. Analytical specificity was evaluated

with reactive samples to HIV-1 and HTLV-I. **Results:** the analysis of the immobilized peptide variants to nitrocellulose membranes showed that the gp36 peptide-BSA was the one that succeeded in setting the greatest differentiation between positive and negative samples. There were observed 100 % sensitivity, 95.2 % diagnostic specificity and 100 % analytical specificity. **Conclusions:** the gp36-BSA peptide immobilized on nitrocellulose membranes showed efficacy for the serological diagnosis of HIV-2, which will allow considering this peptide for diagnostic uses in systems with nitrocellulose -based solid phase.

Key words: peptide gp 36, HIV-2, nitrocellulose.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hawkes R, Niday E, Gordon J. A Dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem.* 1982;119:142.
- Raoult D and Dasch GA. The line blot: an immunoassay for monoclonal and other antibodies. *J Immunol Methods.* 1989;125:57-65.
- Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis: The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc.* 1983;85:2149.
- Alcaro MC, Peronia E, Roverob P, Papinia AM. Synthetic peptides in the diagnosis of HIV infection. *Curr Protein Pept Sci.* 2003;4:285-90.
- Ravanshad M, Sabahi F, Mahboudi F, Roostaee MH, Forooshani RS, Kazemnejad A. An accurate confirmation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and 2 (HIV-2) infections with a dot blot assay using recombinant p24, gp41, gp120 and gp36 antigens. *Int J Med Sci.* 2004;1(3):193-200.
- Carter JM. Techniques for conjugation of synthetic peptides to carrier molecules. En: *Methods in Molecular Biology.* vol 36, Totowa, NJ: Editorial Humana Press Inc.; 1994. p. 155-91.
- Gómez CE, Lopez-Campistrous AE, Duarte CA. An Immunoassay with bovine serum albumin coupled peptides for de improved detection of anti V3 antibodies in HIV-1 positive human sera. *J Virol Methods.* 1998;71:7-16.
- Manocha M, Chitrallekha KT, Thakar M, Shashikiran D, Paranjape RS, Rao DN. Comparing modified and plain peptide linked enzyme immunosorbent assay (ELISA) for detection of human immunodeficiency virus type-1 and type-2 (HIV-2). *Immunol Lett.* 2003;85(3):275-8.
- Singh SK, Shah NK, Bisen PS. A synthetic *gag* p24 epitope chemically coupled to BSA through a decaalanine peptide enhances HIV Type 1 serodiagnostic ability by several folds. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2007;23(1):153-60.
- Leakey A, Hirst R, La Broy J. A low molecular weight factor is a significant mediator of non-opsonic neutrophil activation by *Helicobacter pilory*. *J Med.Microbiol.* 2001;50:787-94.
- Bauminger S, Wilchek M. The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. *Meth Enzymol.* 1980;70:151-9.
- Martín D, Silva E, Pérez MT, Díaz DF, Romero K, Díaz HM, et al. Diseño y evaluación del sistema DAVIH VIH-2. *Rev Cubana Med Trop.* 2007;59(3):1-6.
- Chan L, Sum YW, Yin MF, Lim LF. An augmented western blot format and immunoassay for detection of viral antibodies. EP0564460; 1993.
- Chan L, Sum YW, Yin MF, Lim LF. HIV-1/HIV-2 viral detection kit and method. USP 5721095; 1998.
- Casey LJ, Coley AM, Street G, Parisi K, Devine PL, Foley M. Peptide mimotopes selected from a random peptide library for diagnosis of Epstein - Barr virus infection. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):764-71.
- Kannangai R, Ramalingam S, Prakash K, Abraham OC, George R, Castillo RC, et.al. A peptide enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of human immunodeficiency virus type-2 (HIV-2) antibodies: An evaluation on polymerase chain reaction (PCR) confirmed samples. *J Clin Virol.* 2001;22(1):41-6.
- Kline RI, McNairn D, Holodniy M, Mole L, Margolis D, Blattner W, et.al.. Evaluation of Chiron HIV-1/HIV-2 recombinant immunoblot assay. *J Clin Microbiol.* 1996;34(11):2650-3.
- Constantine NT. HIV antibody assays. HIV InSite Knowledge Base Chapter May 2006. Niel reagents of the University of California: The UCSF Center for HIV Information; 2006 [citado 16 May 2007]. Disponible en: <http://hivinsite.ucsf.edu/insite.jsp?page=Kb-02-02-01>
- Marcelino JM, Barroso H, Gonçalves F, Marques Silva S, Novo C, Gomes P, et al. Use of a new dual-antigen enzyme-linked immunosorbent assay to detect and characterize the human antibody response to the human immunodeficiency virus type 2 envelope gp125 and gp36 glycoproteins *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):607-11.
- Krutzik SR, Choi DP, Chung S, Krutzik SR, Nguyen M. Synthetic peptide based one step serological assay of HIV-1 and HIV-2 antibodies. *Int Conf AIDS.* 1996;11(87):7-12 (abstract no. We.B.3178).

Recibido: 9 de octubre de 2010. Aprobado: 25 de noviembre de 2010.
Dervel Felipe Díaz Herrera. Laboratorio de Investigaciones del sida (LISIDA). Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. La Habana, Cuba. Coreo electrónico: feloany@infomed.sld.cu; lisida@infomed.sld.cu.