

Desarrollo de una prueba inmunocromatográfica con avidina-biotina para la detección de anticuerpos contra el antígeno e de hepatitis B en plasma humano

✉ Damían Mainet-González, Daniel O Palenzuela-Gardon, Tamara Díaz-Argudín

División de Inmunodiagnóstico y Genómica, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 190 y 158, AP 6162, CP 10 600, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: damian.mainet@cigb.edu.cu.

TÉCNICA

RESUMEN

La desaparición del antígeno e de hepatitis B con la presencia de los anticuerpos plasmáticos anti-antígeno e puede indicar una respuesta terapéutica satisfactoria en pacientes con hepatitis B crónica. Las pruebas inmunocromatográficas desarrolladas para el diagnóstico de enfermedades utilizan diferentes combinaciones de anticuerpos y pueden emplear la tecnología de avidina o estreptavidina-biotina para aumentar la sensibilidad analítica. Se describe el uso de la avidina-biotina para el desarrollo de una prueba inmunocromatográfica rápida para la detección de anticuerpos anti-antígeno e en plasma. Se detectaron estos en el laboratorio mediante dos pruebas inmunocromatográficas rápidas con la utilización en una de ellas de la tecnología de avidina-biotina. Estas pruebas se desarrollaron con formato de inhibición competitiva de un solo paso y amplificada o no con avidina-biotina. Se aplicaron anticuerpos monoclonales anti-antígeno e obtenidos mediante hibridación celular. Mediante ellas se evaluaron 46 muestras plasmáticas clasificadas en positivas y negativas a los anticuerpos anti-antígeno e con una prueba inmunocromatográfica *Advanced Quality*TM de referencia. Se estudió el posible tiempo de vencimiento de los reactivos biológicos constituyentes de esas pruebas con experimentos de termoestabilidad acelerada. Se analizó la posible interferencia en plasma de algunos compuestos bioquímicos en el uso de esos ensayos. Se obtuvieron 4 anticuerpos monoclonales murinos anti-antígeno e y solo uno de ellos se usó con un anticuerpo policlonal anti-antígeno e conjugado con oro en esas pruebas inmunocromatográficas. Ambas pruebas con sus reactivos biológicos estables discriminaron las muestras positivas y negativas a anticuerpos anti-antígeno e, igual que la prueba comercial. No existió interferencia de los compuestos bioquímicos estudiados en esas pruebas. Las dos pruebas inmunocromatográficas desarrolladas en el laboratorio son útiles para detectar anticuerpos anti-antígeno e en plasma. La avidina-biotina aumentó la sensibilidad analítica de este tipo de prueba inmunocromatográfica rápida sin alterar sus características de ejecución.

Palabras clave: Análisis inmunocromatográfico, avidina-biotina, oro coloidal, hepatitis B, diagnóstico

Biotecnología Aplicada 2007;24:254-264

ABSTRACT

Development of one-step, competitive inhibition, immunochromatographic assay with avidin-biotin for detecting antibodies against antigen e of Hepatitis B in human plasma. The disappearance of antigen e of hepatitis B in the presence of the plasmatic antibodies against antigen e may indicate a satisfactory therapeutic response in patients with chronic hepatitis B. The immuno-chromatographic test carried out in the diagnosis of diseases use different antibody combinations and may employ the avidin or streptavidin-biotin technology to develop a rapid immuno-chromatographic test for the detection of antibodies anti-antigen e in the plasma. They were detected in the laboratory by means of two fast immuno-chromatographic tests when using in one of them the avidin-biotin technology. These tests are carried out with a one-step competitive inhibition format and amplified or not with avidin-biotin. Monoclonal antibodies against antigen e obtained by cellular hybridization were used. Forty-six plasmatic samples classified as positive and negative to the anti-antigen antibodies were evaluated with a reference immunochromatographic test *Advanced Quality*TM. The possible expiry time of the biological reagents forming part of these tests were studied with accelerated thermal-stability experiments. The possible interference in the plasma of some of the biochemical compounds used in these trials was analyzed. Four murine monoclonal antibodies anti-antigen e were obtained and only one of them was used in these immunochromatographic tests with an anti-antigene polyclonal antibody conjugated with gold. Both tests and their stable biological reagents discriminated the positive and negative samples to the antibodies anti-antigen e, as well as the commercial test. There was no interference in the biochemical compounds studied in these tests. Both immuno-chromatographic tests made in the laboratory are useful to detect antibodies anti-antigen e in the plasma. The avidin-biotin increased the analytical sensitivity of this type of fast immuno-chromatographic test without altering its performance features.

Keywords: immunochromatographic assay, avidin-biotin, colloidal gold, hepatitis B, diagnosis

Introducción

La hepatitis viral B (HB) es un problema global, afecta alrededor del 5% de la población mundial [1]. Es la primera causa de cirrosis y carcinoma hepatocelular. La proteína natural de antígeno e de HB (AgeHB) se origina de una parte del gen del antígeno de core de HB

(AgcHB) y comparte una gran homología en la secuencia aminoacídica con el AgcHB. Sin embargo, estos antígenos serán reconocidos por anticuerpos naturales contra epítomos diferentes de ambas macromoléculas [2]. La desaparición del AgeHB con la aparición de an-

1. Park W, Keeffe EB. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B. *Minerva Gastroenterol Dietol* (2004); 50:289-303.

ticuerpos antiAgeHB en plasma es un indicador de buen pronóstico y de una adecuada respuesta terapéutica antiviral de aquellos pacientes infectados aguda o crónicamente con el virus de HB (VHB) de tipo salvaje [2, 3]. También la presencia durante años de esos anticuerpos en pacientes con pruebas diagnósticas negativas a AgeHB indica una infección crónica con mutantes de la región génica precore del VHB [1] el pronóstico de esos pacientes es desfavorable.

Los ensayos inmunocromatográficos aportan una manera de acelerar los procedimientos analíticos y también una forma de realización de las pruebas diagnósticas con una utilización menos posible de reactivos. Estos análisis se pueden hacer en el lugar de recogida de las muestras biológicas y no necesariamente en los lugares donde existe personal y equipamiento especializado. Se han descrito ensayos inmunocromatográficos para la detección de anticuerpos o antígenos que pueden ser no competitivos o competitivos [4]. En los ensayos no competitivos a medida que los analitos están aumentado en la muestra, mayor es la coloración en la tira. En esos ensayos se considera una respuesta positiva o negativa en dependencia de la presencia o no del analito, respectivamente. Mientras que en los análisis competitivos sucede lo contrario, a mayor cantidad de analito en la muestra más rápidamente disminuye la señal. En los inmunoanálisis competitivos se considera una muestra positiva cuando no aparece señal en la tira y una muestra negativa cuando aparece la coloración en la tira [4].

En estos inmunoensayos rápidos de un solo paso basados en membranas de flujo lateral se ha utilizado la tecnología de avidina o estreptavidina-biotina para aumentar la sensibilidad analítica [5-7]. Se ha aplicado la estreptavidina o avidina en la zona de captura específica de la membrana de nitrocelulosa y dos anticuerpos que reconocen dos sitios diferentes del analito en la almohadilla de la muestra [5]. Uno de esos anticuerpos es biotinilado y el otro está conjugado con oro. Esos dos anticuerpos reaccionan durante más tiempo con el analito a detectar de la muestra biológica y forman un complejo antígeno-anticuerpo que será mucho mejor atrapado por la estreptavidina en la zona de captura específica de la prueba en un tiempo reducido.

En los ensayos descritos se aprovechan las siguientes características de la interacción entre la estreptavidina o la avidina por la biotina:

- Ser una de las uniones "no covalentes" más fuertes hasta ahora conocidas (la constante de afinidad de esa unión es 10^{15} M^{-1}).

- Ser una unión altamente específica, en la avidina y la estreptavidina existen 4 sitios de unión a la biotina, si se añade a esta última (una pequeña molécula de 244 Da) un brazo espaciador se puede conjugar a los anticuerpos sin alterarse su actividad biológica ni la de esa macromolécula.

- Presentar la avidina y la estreptavidina una gran estabilidad ante diferentes condiciones de reacción e inmovilización en fases sólidas sin afectarse sus sitios de unión por la biotina [8].

Existen diferencias entre la estreptavidina y la avidina una de ellas está dada por el punto isoelectrónico, en la primera oscila entre 10 y 10.6 y en la segunda entre 6.4 y 6.6. El otro aspecto es que la estreptavidina no presenta molécula de carbohidratos en su estructura y

la avidina es una glicoproteína [8, 9]. La avidina utilizada en inmunoanálisis con problemas de inespecificidad se puede sustituir por la estreptavidina, porque esta última no presenta una carga fuertemente positiva en las pruebas que se realizan a pH neutro, su interacción con moléculas cargadas negativamente está disminuida y no es atrapada por las moléculas que unen carbohidratos (como son: las lecitinas de la superficie celular) de las muestras biológicas, sobre todo en técnicas inmunohistoquímicas.

En el mercado existen ensayos inmunocromatográficos para la detección de anticuerpos antiAgeHB que contienen dos grupos de anticuerpos: uno conjugado con oro en la almohadilla macroporosa y el otro, recubierto en la nitrocelulosa. Ambos anticuerpos reconocen el AgeHB por dos sitios y pueden ser inhibidos competitivamente por la presencia de anticuerpos en la muestra biológica [10, 11]. La detección de anticuerpos anti-AgeHB en plasma utilizando la tecnología de avidina o estreptavidina-biotina en una prueba inmunocromatográfica de inhibición competitiva no se ha reportado.

En el presente artículo se describe el desarrollo de dos pruebas inmunocromatográficas para la detección de anticuerpos plasmáticos antiAgeHB, en las cuales se utilizan anticuerpos monoclonales (AcM) anti-AgeHB recombinantes generados en el laboratorio. Una prueba inmunocromatográfica aplica el primer formato anteriormente enunciado y la otra, añade el uso avidina-biotina para aumentar la sensibilidad en la detección de esos anticuerpos. Ambos ensayos inmunocromatográficos se estandarizaron y se realizaron estudios de estabilidad acelerada de sus reactivos biológicos. Con esas dos pruebas elaboradas en el laboratorio se evaluaron 46 muestras plasmáticas clasificadas en positivas y negativas de acuerdo con la presencia de anticuerpos antiAgeHB por una prueba inmunocromatográfica *Advanced Quality™* (InTec Products Inc., Xiamen, China) de referencia.

Materiales y métodos

Generación y biotinilación del AcM anti-AgeHB recombinante

La obtención de anticuerpos monoclonales se realizó como se ha descrito en otras ocasiones [12, 13]. Brevemente: se inmunizaron ratones BALBc hembras, con 50 µg AgeHB recombinante (AgeHBr, SD *Standard Diagnostic Inc.*, Kionggi-do, Corea) mezclado en igual volumen de adyuvante completo la primera vez, y luego, incompleto de *Freund* (*Sigma*, Saint Louis, EUA) e inyectados a los ratones por vía subcutánea. La inmunización final del antígeno se hizo por vía intraperitoneal con la misma cantidad ya indicada, disuelto en la solución salina de fosfato pH 7.2 a los 3 días antes de la fusión. Los hibridomas fueron obtenidos por el método de fusión con polietilenglicol 1600 (*Sigma*, St Louis, EUA) de los mielomas P3X63-Ag8-653 y los linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados, en una relación 10 a 1. Los cultivos positivos seleccionados en un inmunoanálisis enzimático (que se describe más adelante) fueron clonados en 2 ocasiones por el método de dilución limitante. Para la determinación de la subclase de los AcM seleccionados se siguieron las instrucciones del fabricante

2. Coppola R, Rizzetto M, Bradley DW. Hepatitis B. In: Crivelli O, editor. *Viral hepatitis. Handbook*. Saluggia (Italy). Sorin Biomedica Diagnostics SpA (1996). p. 27-56.

3. Lebray P, Vallet-Pichard A, Marie-Louise M, Fontaine H, Sobeski R, Brechot C et al. Immunomodulatory drugs and Therapeutic Vaccine. In *Chronic Hepatitis B Infection. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B* [serial online]. 2002. [19 screens]. Available from: URL: <http://www.easl.ch/hbv2002/abstracts/4.1745.doc> (consultado: 7 de junio de 2007).

4. Millipore Corporation. A short guide for developing immunochromatographic test strips. [36 screens] (1996). Available from: URL: <http://www.millipore.com> (consultado: 29 de octubre de 2007).

5. Müller-Bardorff M, Freitag H, Scheffold T, Remppis A, Küller W, Katus HA. Development and characterization of a rapid assay for bedside determination of cardiac troponin T. *Circulation* (1995); 92(10):2869-75.

6. Paek SH, Cho JH. Semiquantitative, bar code version for immunochromatographic assay system for human serum albumin as model analyte. *Biotechnology and Bioengineering* (2001); 75(6):725-32.

7. Pronovost AD, Boehringer H, Hsu Y, inventors; Quidel Corp (US), assignee. One-step lateral flow assays. US Patent 6656744. 2003 Feb 12. Available from: URL: <http://www.freepatentsonline.com/6656744.html> (consultado: 14 de septiembre 2007).

8. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(Strep) Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. *Clin Chem* (1991); 37(5):625-36.

9. Wilchek M and Bayer EA. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Analytical Biochemistry* (1988); 171:1-32.

10. Manual of Instructions of Advanced Quality™ One Step HBeAb Test (serum/plasma) InTec Products, Inc (online, two screens). Available from URL: <http://www.asintec.com/en/> (consultado: 13 de junio de 2006).

11. Manual of Instructions of INTL Immuno-Diagnostics Anti-HBe (HBeAb) Detection Card Test in serum. International Immuno-Diagnostics. 1155 Chess Drive #121 Foster City, CA 94404. (Recibido en enero de 2006) por correo electrónico: intl-i-d@ix.netcom.com.

12. Gavilondo-Cowley JV. Anticuerpos monoclonales: Teoría y Práctica. Ciudad de La Habana: Elfos Scientiae (1995).

13. Mainet González D, Sorell Gómez L, Pichardo Díaz D, Reyes Acosta O, Torres Cabrera MB, Abdo Cuza A et al. Evaluación de un inmunoensayo rápido de cuantificación de troponina I cardíaca en el diagnóstico de infarto agudo del miocardio. *Rev Quím Clín* (2003); 22(6): 419-30.

(Amersham, Reino Unido) de un estuche comercial de isotipificación de AcM de ratón en los sobrenadantes de cultivo celular.

Los hibridomas seleccionados se crecieron como tumores ascíticos en ratones BALBc previamente inoculados por vía intraperitoneal con 2, 6, 10, 14 tetrametilpentadecano (*Pristane de Sigma*, St Louis, EUA) y los anticuerpos de la ascitis fueron purificados por cromatografía de afinidad usando proteína A sefarosa CL 4B (*Pharmacia Biotech*, Uppsala, Suecia). Se evaluó su pureza mediante electroforesis de gel de poliacrilamida al 15% con dodecil sulfato de sodio [9]. Se conservaron debidamente alicuotados a -20 °C. Los anticuerpos purificados fueron conjugados a NHS-LC-biotina (*Sigma*, St Louis, EUA) según *Perlman* [14].

Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos antiAgeHBr

Se empleó un ensayo inmunoenzimático indirecto para la determinación de anticuerpos antiAgeHBr en suero de ratones inmunizados, sobrenadantes de cultivos y anticuerpos purificados como se describe en otras publicaciones [12, 13]. Brevemente: las placas de microtitulación de poliestireno de 96 pozos de fondo plano *Maxisorp* (*Nunc*, Roskilde, Dinamarca) fueron recubiertas con 50 µL/pozo de AgeHBr a 20 µg/mL en bicarbonato-carbonato de sodio (*Merck*, Darmstadt, Alemania) 50 mM pH 9.6 durante 16 h a 4 °C. A las placas, después de lavadas y bloqueadas, se les añadieron las diferentes diluciones de los sueros de ratones inmunizados con el antígeno (control positivo) y como control negativo las diluciones del sobrenadante de cultivo del AcM antiantígeno de superficie de HB CBHep.1 (CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba) o de ese mismo anticuerpo purificado. También, se empleó como control positivo un AcM comercial antiAgeHB (*SD Standard Diagnostic*, Kionggi-do, Corea) a una concentración de 20 ng/mL. Se lavaron las placas y se aplicó 100 µL/pozo de un conjugado antiinmunoglobulina G de ratón peroxidasa en carnero elaborado en el laboratorio (1/2000) y en el segundo tamizaje de los sobrenadantes de cultivo se usó un conjugado anti-fragmento Fc de inmunoglobulinas G de ratón-peroxidasa (*Sigma*, St Louis, EUA) diluido 1/40 000. Después de lavadas las placas, se usó como cromógeno la ortofenilendiamina y luego de parada la reacción, se leyó la placa de microtitulación en un lector de placa PR-521 (*Tecnosuma Internacional*, Ciudad de La Habana, Cuba) a una longitud de onda de 492 nm. Se consideró positivo cuando las absorbancias de los pozos correspondientes a los sobrenadantes de cultivo o sueros de ratón que se evaluaban fueron mayores de 2 veces que la absorbancia del control negativo del método. En la determinación de la especificidad de los AcM se utilizó este mismo inmunoanálisis enzimático y se recubrió a 20 µg/mL de AgcHB recombinante (AgcHB, CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba) y 1 µg/mL de antígeno de superficie de HB recombinante (CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba).

Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos antiAgeHBr que reconocen al AgcHB en solución

Se aplicó el mismo protocolo descrito anteriormente, pero se realizaron dos ensayos inmunoenzimáticos

independientes. En el primer ensayo se determinó la dilución de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas antiAgeHBr y de un hibridoma que secreta anticuerpos antiantígeno no relacionado (antitropoina I cardíaca) donde no ocurre saturación de la señal del ensayo, aplicando las muestras en las diluciones: 1/2, 1/12, 1/72 y 1/432. Se determinó la dilución de los sobrenadantes de cultivos de hibridomas antiAgeHBr de no saturación de la señal de absorbancia que fue 1/72 en ese ensayo y esta dilución de las muestras se usó en el siguiente experimento. En el segundo inmunoensayo enzimático en el paso de dilución de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas antiAgeHBr (muestras) y del hibridoma antitropoina I cardíaca [13] se añadió 20 µg/mL y 1 µg/mL de AgeHBr y se aplicaron en 2 pozos independientes en un volumen final de 50 µL/pozo, y así sucesivamente se realizó con otros dos antígenos en iguales concentraciones: AgcHB y de albúmina de suero humano (*Sigma*, St Louis, EUA). Se incluyó además en ese paso un duplicado de pozos para cada una de las diluciones de los sobrenadantes de cultivo de hibridomas donde no se añadió ninguna otra proteína. El ensayo continuó como en el acápite anterior. El cálculo de porcentaje de inhibición se realizó con la siguiente fórmula: % de inhibición = $((\text{abs } c^+ - \text{abs } m) / (\text{abs } c^+ - \text{abs } c^-)) * 100\%$, donde la abs m corresponde al promedio del duplicado de las absorbancias del sobrenadante de cultivo de un hibridoma con anticuerpos antiAgeHBr que se le añadió antígeno a la dilución, abs c⁺ es el promedio del duplicado de las absorbancias del sobrenadante de cultivo con anticuerpos de una especificidad diferente al antígeno añadido y abs c⁻ es el promedio del duplicado de absorbancias del sobrenadante de cultivo del mismo hibridoma en análisis sin añadirle antígeno a la dilución. Se consideró que hubo inhibición cuando fue mayor del 20%. En ese porcentaje se incluyó el promedio más dos desviaciones estándar de la inhibición que hubo en algunos sobrenadantes de cultivo de los hibridomas estudiados cuando se añadió albúmina sérica humana.

Principio de las pruebas inmunocromatográficas amplificadas o no con avidina-biotina

La tira de nitrocelulosa con un soporte posterior plástico que contiene una capa de goma adhesiva (con un poro de 10 µm y dimensiones de 86 mm x 5 mm), la almohadilla absorbente (38 mm x 5 mm) y la almohadilla macroporosa (con un poro de 10 µm y unas dimensiones de 26 mm x 5 mm) -adquiridas de *Advanced Microdevices, Ltd*, Ambala, India- constituyen la fase sólida de ambas pruebas (Figura 1a). Los surfactantes: *Pluronic*TM e *Igepal*TM y los polímeros *Kucell*TM y polietilenglicol o PEG 8 000 (estuche comercial de *Pragmatics Inc.*, Indiana, EUA) fueron usados como agentes bloqueantes de reacciones inespecíficas y aditivos estabilizantes en esas pruebas. Se aplicaron 150 ng de la poli-L-lisina (*Sigma*, St Louis, EUA) en la zona control de funcionamiento de la tira de nitrocelulosa de las dos pruebas inmunocromatográficas (que se encuentra aproximadamente a 20 mm del borde inferior de la membrana de nitrocelulosa) y el AcM antiAgeHBr, en la zona de captura específica de la prueba no amplificada (Figura 1b). Esta última zona se encuentra aproximadamente a 15 mm del borde inferior de la membrana de nitrocelulosa y en ella se

14. Perlmann H, Perlmann P. Enzyme linked immunoabsorbent assay. *Cell Biology: A laboratory handbook*. San Diego: Academic press Inc. (1994). p. 323-4.

aplicó la avidina (*Sigma*, St Louis, EUA) en la prueba amplificada (Figura 1c). En ambas pruebas se usó una combinación de dos anticuerpos: uno fue el AcM antiAgeHB y el otro, un anticuerpo policlonal en ración antiAgeHB conjugado con partículas de oro coloidal (AcP-oro). El conjugado comercial de AcP-oro (*SD Standard Diagnostic*, Kionggi-do, Corea) que tiene una densidad óptica (DO) de 10 a 540 nm (con un diámetro de la partícula de oro de 40 nm) se aplicó en el extremo superior de la almohadilla macroporosa. En las dos pruebas el AgeHB fue vertido a diferentes concentraciones (según el experimento) a 5 mm de borde inferior de la almohadilla macroporosa. Dicho antígeno fue añadido simultáneamente con el AcM antiAgeHB-biotinilado en la prueba amplificada.

Una vez que los reactivos aplicados en la membrana de nitrocelulosa y en la almohadilla macroporosa se secan, se procede a montar la almohadilla macroporosa en la parte inferior de la tira inmunocromatográfica y la almohadilla absorbente a la parte superior de esta. El borde superior de la almohadilla macroporosa y el borde inferior de la almohadilla absorbente se solapan con la membrana de nitrocelulosa de la tira inmunocromatográfica. Las pruebas inmunocromatográficas comienzan cuando la tira de nitrocelulosa con todos sus elementos montados se introduce por la parte inferior de la almohadilla macroporosa en un pozo de una placa de plástico inerte de 96 pozos y fondo plano (*Polylabo*, París, Francia) que contiene 100 µL de plasma humano (Figura 1a, 1b y 1c). Esa muestra de plasma comenzará a migrar por la capilaridad de la tira. Ambas pruebas fueron retiradas de los correspondientes pozos a los 20 min de la corrida inmunocromatográfica a temperatura ambiente (de 20 a 25 °C) y el resultado fue leído en ese momento

(Figura 1d). Se consideró un resultado negativo si aparecían dos manchas visibles en la zona de reacción. El resultado fue positivo si solo apareció una mancha correspondiente al control de funcionamiento de la prueba y un resultado de prueba “no válida” se consideró cuando no apareció ninguna señal. En este último caso, la prueba fue repetida. Las lecturas visuales de los resultados de las dos pruebas inmunocromatográficas se realizaron con una adecuada iluminación.

En la prueba no amplificada donde se evaluó una muestra sin anticuerpo antiAgeHB, el AgeHB aplicado en la almohadilla macroporosa fue trasladado por el plasma hasta el final de la almohadilla macroporosa y fue unido al AcP-oro. Después, ese complejo antígeno-anticuerpo llega a la zona de captura donde es atrapado por el AcM antiAgeHB inmovilizado. La concentración de las partículas de oro de ese complejo inmunológico da origen a una mancha rojo púrpura en esa región. Al continuar migrando en el frente de corrida, el anticuerpo conjugado con oro que no reaccionó con el antígeno fue atrapado en una segunda zona de captura inespecífica donde está la poli-L-lisina cargada positivamente que interactúa con las cargas negativas de las partículas de oro. En este momento, se comenzó a originar una segunda señal que funciona como control de que hubo migración del AcP-oro en la matriz biológica a través de la línea de captura específica (Figura 1b y 1d). En caso de haber anticuerpos anti-AgeHB en el plasma, estos se combinan con el AgeHB e inhiben primeramente la unión de este antígeno con el AcP-oro en la almohadilla macroporosa y luego, con el AcM presente en la línea de captura de la nitrocelulosa.

En la prueba amplificada con avidina-biotina, la muestra de plasma sin anticuerpos antiAgeHB arras-

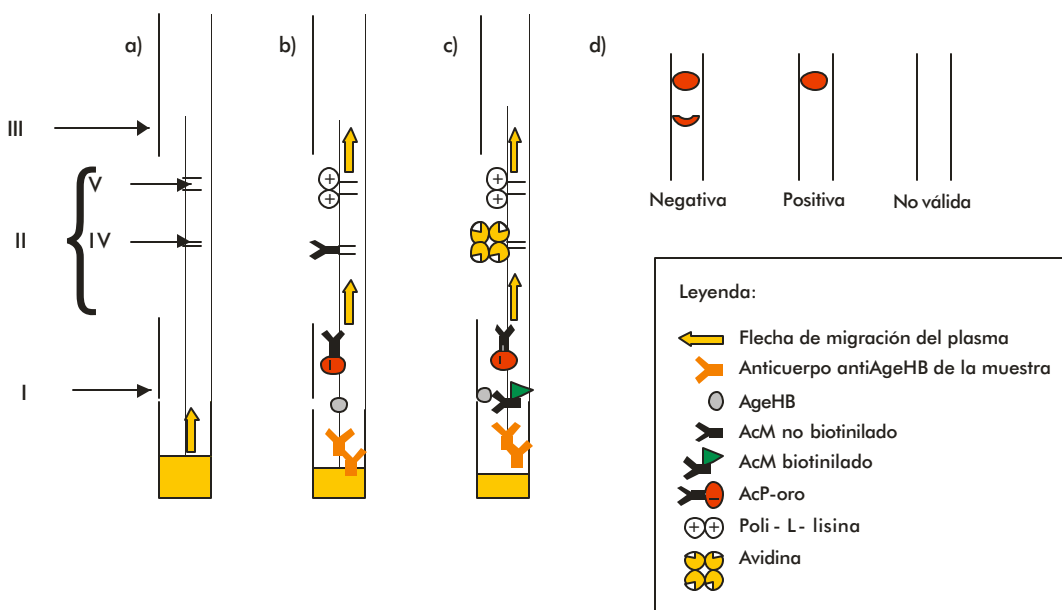


Figura 1. Vista lateral de los principales partes (a) de una prueba inmunocromatográfica de detección de anticuerpos antiantígeno e de Hepatitis B (antiAgeHB) no amplificada (b) y amplificada con avidina-biotina (c) y de sus posibles resultados en una vista frontal de la prueba después de 20 min de corrida la muestra (d). En la figura a): I corresponde a la almohadilla macroporosa, II a la membrana de nitrocelulosa de la tira inmunocromatográfica, III a la almohadilla absorbente, IV a la zona de captura específica y V a la zona de control de funcionamiento de la prueba. AgeHB significa AgeHB recombinante; AcM, anticuerpo monoclonal antiAgeHB y AcP-oro, conjugado de anticuerpo policlonal antiAgeHB-oro.

tró el AgeHBr con el AcM biotilado aplicado en la almohadilla macroporosa hasta el sitio donde el AcP-oro fue secado. En ese trayecto ocurrió la interacción de esos reactivos entre sí. Luego, ese complejo fue atrapado en la zona de captura específica de la nitrocelulosa con la avidina inmovilizada y produjo una mancha, el AcP-oro sobrante fue unido posteriormente por la poli-L-lisina y apareció una segunda señal. Esa situación corresponde a la presencia de anticuerpos antiAgeHB en una muestra negativa. En caso de muestra positiva a esos anticuerpos ocurrió una sola señal a causa de que el AgeHBr fue reconocido por estos, que bloquearon la unión del anticuerpo biotilado y del conjugado AcP-oro a ese antígeno, por lo que no se formó el complejo que podría ser atrapado por la avidina inmovilizada en la nitrocelulosa (Figura 1c y 1d).

Optimización de la prueba inmunocromatográfica sin amplificar

La solución de AcM antiAgeHB se aplicó en un volumen de 2 μ L en la nitrocelulosa a diferentes cantidades: 0.4, 0.8, 1.8, 3.5, y 7 μ g en un diluyente que contiene trehalosa (*Sigma*, St Louis, EUA) 5% (p/v) e *Igepal* 0.05% (v/v) de concentración final. La solución de AcM antiAgeHB control correspondió a un lote anterior de ese anticuerpo purificado. Se vertió 1 μ L de 150 ng de poli-L-lisina diluida en una solución de trehalosa 10% en la zona de control de funcionamiento de la prueba. Se incubó la tira de nitrocelulosa a 37 °C durante 16 h. Las soluciones de AcP-oro y de AgeHBr fueron diluidas 1/2 y 1/5, respectivamente en una solución madre de bloqueo y termoestabilizante compuesta de Tris (*Spectrum*, Gardena, EUA) 20 mM pH 8.5, albúmina sérica bovina (BDH, Inglaterra, Reino Unido) 10% (p/v), trehalosa 20% y Pluronic 0.1% (v/v). Se aplicaron 2 μ L de ambas soluciones diluidas en la almohadilla macroporosa en los dos sitios diferentes ya mencionados anteriormente y se incubó esta almohadilla a 37 °C durante 1 h. La cantidad final de AgeHBr añadido fue 80 ng. Luego, la almohadilla macroporosa y la almohadilla absorbente fueron montadas en la tira de nitrocelulosa. Cada condición de recubrimiento del AcM antiAgeHBr fue analizada con una muestra de plasma negativa y otra positiva a anticuerpos antiAgeHB (Figura 2).

El AcP-oro se optimizó diluyéndolo al 50% en el diluyente mencionado y se aplicó 1 μ L, 2 μ L, 3 μ L, 4 μ L, 5 μ L y 6 μ L en el borde superior de la almohadilla macroporosa. Después, se incubó durante 1 h a 37 °C. En cada condición de conjugado fue probada una muestra de plasma con anticuerpos antiAgeHB y sin ellos. El recubrimiento de la nitrocelulosa con el AcM antiAgeHBr fue de 1.8 μ g por cada tira inmunocromatográfica. Las condiciones de recubrimiento de poli-L-lisina en la nitrocelulosa y la aplicación de 80 ng de AgeHBr en el material macroporoso fueron similares a las mencionadas en el párrafo anterior.

Se probaron diferentes cantidades de AgeHBr a neutralizar en la almohadilla macroporosa: 100 ng, 80 ng, 60 ng, 40 ng y 20 ng diluido 1/5 en el tampón madre de bloqueo y termoestabilizante. En esas almohadillas macroporosas en dos sitios diferentes se aplicó un volumen final de 2 μ L de las soluciones de AgeHBr y 2.5 μ L de AcP-oro. Dichas almohadillas se incubaron a 37 °C durante 1 h para el secado de esos

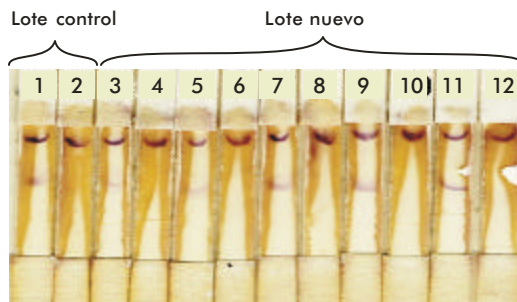


Figura 2. Titulación de la cantidad de anticuerpo monoclonal (AcM) antiAgeHB en la prueba inmunocromatográfica no amplificada. El lote control de AcM antiAgeHB se añadió a 3 μ g (2 μ L) en la zona de captura específica de la membrana de nitrocelulosa de las pruebas inmunocromatográficas 1 y 2. El lote nuevo del AcM antiAgeHB fue aplicado en un volumen de 2 μ L en las cantidades siguientes: 0,4 μ g en las pruebas 3 y 4; 0,8 μ g en las pruebas 5 y 6; 1,8 μ g en las pruebas 7 y 8; 3,5 μ g en las pruebas 9 y 10; y 7 μ g en las pruebas 11 y 12. La corrida inmunocromatográfica de la muestra plasmática negativa para los anticuerpos antiAgeHB fue realizada en las pruebas 1, 3, 5, 7, 9, 11 y la corrida inmunocromatográfica de la muestra plasmática positiva para estos anticuerpos, en las pruebas: 2, 4, 6, 8, 10 y 12.

reactivos biológicos. El recubrimiento de la nitrocelulosa con 1.8 μ g de AcM antiAgeHBr y 150 ng de poli-L-lisina se realizó como se ha descrito anteriormente. Para cada condición de AgeHBr se evaluó una muestra de plasma positiva y otra negativa a anticuerpos antiAgeHB.

Optimización de la prueba inmunocromatográfica amplificada

Las tiras de nitrocelulosas fueron recubiertas en la zona de captura específica con 2 μ L (2 μ g) de una solución de avidina (*Sigma*, St Louis, EUA) a 10 mg/mL diluida 1/10 bajo dos condiciones: en agua destilada con un pH final entre 3 a 4 (papel de pH de *BDH*, Inglaterra, Reino Unido) y en un tampón de bicarbonato-carbonato 10 mM pH 9.6 (con un pH final entre 9-10 en el papel de pH de *BDH*). También la nitrocelulosa fue recubierta en la zona de control de funcionamiento de la prueba con la solución de poli-L-lisina. Luego se secaron las tiras a 37 °C durante 16 h. Las soluciones de AcP-oro y de AgeHBr con el AcM antiAgeHBr biotilado fueron aplicadas en la almohadilla macroporosa con una solución madre de bloqueo y termoestabilizante (que es la misma utilizada en la prueba inmunocromatográfica no amplificada) diluida 1/2 y 1/5, respectivamente. Se aplicó 2 μ L de las soluciones diluidas de AcP-oro y de la dilución conjunta de AgeHB (80 ng) más el AcM antiAgeHBr biotilado (400 ng) en el material macroporoso. Como control negativo se vertió 2 μ L de 80 ng de AgeHBr más 400 ng del AcM antiAgeHBr no biotilado en esa almohadilla. Se secaron el conjugado y el antígeno con el AcM biotilado y no biotilado a 37 °C durante 1 h. Luego, la almohadilla macroporosa y la almohadilla absorbente se montaron en la tira de nitrocelulosa. Se introdujeron las pruebas en 100 μ L/pozo de una muestra de plasma negativa a anticuerpos antiAgeHB.

Diferentes relaciones de masa de AgeHBr y el AcM antiAgeHBr biotilado fueron probadas con vista a

disminuir la cantidad de AgeHBr a neutralizar en la prueba inmunocromatográfica amplificada. Se aplicó 2 μ L de 80 ng de AgeHBr con 400 ng de AcM biotinilado y 40 ng del primero con 400 ng del segundo. Después siguieron las relaciones: 80 ng, 40 ng y 10 ng de AgeHBr con 100 ng de AcM biotinilado y por último, se aplicaron 80 ng; 40 ng; 10 ng; 2.5 ng y 1.25 ng de AgeHBr con 25 ng de AcM biotinilado. El control negativo fue la relación de 400 ng de AcM antiAgeHBr no biotinilado con 80 ng de AgeHBr. Se usó como muestra un plasma negativo a anticuerpos antiAgeHB (Figura 3).

Comparación de las dos pruebas inmunocromatográficas con la prueba inmunocromatográfica comercial para la detección de anticuerpos antiAgeHB

Un grupo de 46 muestras de plasma con anticuerpos antiAgeHB y sin ellos fueron evaluadas en una prueba inmunocromatográfica *Advanced Quality*TM de detección de anticuerpos antiAgeHB. Este ensayo inmunocromatográfico comercial fue realizado según instrucciones del fabricante (ha tenido una alta equivalencia en la detección de anticuerpos antiAgeHB en 1000 muestras con respecto a un inmunoanálisis enzimático) [10]. Los posibles resultados en una vista superior de esa prueba comercial son similares a la lectura realizada a las pruebas elaboradas en el laboratorio (Figura 1d). Después, esas muestras analizadas en la prueba comercial de referencia fueron estudiadas con las dos pruebas inmunocromatográficas del laboratorio.

Prueba de interferencia de los anticuerpos antiAgcHB, la biotina, el interferón alfa 2b y la heparina en las pruebas inmunocromatográficas

Un grupo de 5 muestras plasmáticas fueron negativas a los anticuerpos antiAgeHB y positivas a los anticuerpos antiAgcHB en un ensayo inmunocromatográfico multiprueba (Multi-HBV) de un solo paso de *Advanced Quality (InTec Products, Inc., Xiamen, China)*. Ese ensayo comercial que determina esos 2 tipos de anticuerpos, además de otros 3 marcadores

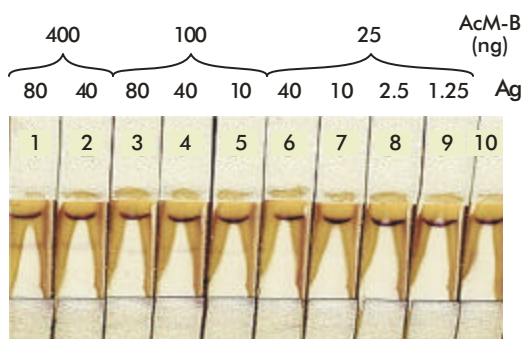


Figura 3. Determinación de la relación óptima de antígeno e de Hepatitis B recombinante (AgHBr) y anticuerpo monoclonal antiAgeHB. CBHepB.AgE biotinilado (AcM-B) en la almohadilla macroporosa de la prueba inmunocromatográfica amplificada de detección de anticuerpos antiAgeHB. La prueba inmunocromatográfica 10 corresponde a la relación 400 ng de AcM CBHepB.AgE no biotinilado y 80 ng de AgeHBr.

relacionados con el diagnóstico de Hepatitis B se realizó según las instrucciones del fabricante. Ese grupo de 5 muestras fue evaluado con las dos pruebas inmunocromatográficas del laboratorio para comprobar que no existe interferencia de esos anticuerpos antiAgcHB en la determinación de anticuerpos antiAgeHB.

La biotina (*BDH*, Inglaterra, Reino Unido) y el interferón alfa 2b recombinante (CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba) se adicionaron a 20 ng/mL y 100 ng/mL de cada uno de ellos en un plasma negativo y otro positivo a anticuerpos antiAgeHB. Se incluyeron como control negativo esos plasmas positivos y negativos sin añadir dichos reactivos. Se corrieron todas esas muestras en las pruebas inmunocromatográficas desarrolladas en el laboratorio.

La interferencia de la heparina (*Imefa*, Ciudad de La Habana, Cuba) fue estudiada en la prueba inmunocromatográfica sin amplificar y amplificada. En ambas se probaron tres concentraciones de heparina: 0 UI/mL, 2 UI/mL y 10 UI/mL en muestras de plasma sin anticuerpos antiAgeHB y con ellos. La poli-L-lisina fue recubierta a 150 ng en los dos tipos de pruebas. A cada tira de nitrocelulosa de esas 12 pruebas inmunocromatográficas de cada tipo se les montó una almohadilla macroporosa que tenía aplicados y dejados secar en el extremo superior: 2.5 μ L de AcP-oro diluidos previamente con el tampón termoestabilizante y bloqueante al 50%. Después, esos dos tipos de pruebas se repitieron con la aplicación de 2 μ g (2 μ L) de antiinmunoglobulina G de ratón en carnero (CIGB de Sancti Spiritus, Cuba) secados durante 1 h a 37 °C, en vez de poli-L-lisina; en la zona de control de funcionamiento de la prueba. Luego, esas pruebas se introdujeron en los pozos que contenían la muestra de plasma positiva y negativa a los anticuerpos antiAgeHB con las diferentes concentraciones de heparina citadas anteriormente.

Procesamiento de las muestras

Las muestras utilizadas pertenecen al banco de plasma-citrato de sodio 0.8% (p/v) y plasma-EDTA (2 mg/mL de sal disódica de ácido etilendiaminatetracético) de muestras anónimas positivas y negativas al antígeno de superficie de HB o de anticuerpos antiAgcHB del Departamento de Inmunodiagnóstico conservadas a -20 °C. Se descongelaron y fueron centrifugadas previamente a 4 000 g durante 15 min a temperatura ambiente antes de usar para eliminar los restos de fibrinas. Se prepararon alícuotas para no aumentar a más de 3 los ciclos de descongelación-congelación. Los plasmas hemolíticos o muy espesos o con restos de fibrinas no fueron analizados.

Prueba de termoestabilidad de los componentes de las pruebas inmunocromatográficas

Los componentes principales de los inmunoanálisis, el AcM AntiAgeHBr, el AcP-oro, AgeHBr, el AcM antiAgeHBr biotinilado y la avidina fueron objeto de ensayos en dos concentraciones de trehalosas con otros aditivos para evaluar la estabilidad a 60 °C a los 3 y 5 días, comparados con la temperatura de 20 a 25 °C. Se usó una muestra de plasma positiva y otra negativa a anticuerpos antiAgeHB. El volumen de la solución

de poli-L-lisina (150 µg/mL) diluida en trehalosa al 10% usada en todos los experimentos fue de 1 µL. En la prueba inmunocromatográfica sin amplificar, el AcM fue absorbido a la nitrocelulosa con solución de igeal 0.05% y trehalosa al 4% y 8% y el conjugado de AcP-oro fue aplicado en el material macroporoso diluido al 50% en el tampón de bloqueo y termoestabilizante en dos concentraciones finales de trehalosa: 10% y 20%. En la prueba inmunocromatográfica amplificada 2 µg de la avidina, diluida en bicarbonato-carbonato 10 mM pH 9.6 sin trehalosa y con trehalosa al 5% y al 10%, fue recubierta en la tira de nitrocelulosa. La proporción de 200 ng de AcM biotilado con 40 ng AgeHB fue aplicada en la almohadilla macroporosa en su diluyente 1/5 con trehalosa al 4% y al 8%.

Se exponen brevemente los demás pasos de almacenamiento de estas pruebas [15]. Las tiras inmunocromatográficas y las almohadillas macroporosas con los diferentes reactivos biológicos y sus aditivos estabilizantes y bloqueantes de inespecificidad fueron introducidas separadamente en distintos envases de nailon metalizado con una bolsita desecante de gel de sílice *Minipax*TM (*Multiform Desiccants Inc.*, Nueva York, EUA) dentro. Posteriormente, esos envases fueron sellados. Luego, un grupo de las tiras y otro grupo de las almohadillas selladas en nailon fueron colocados en un horno (*Yamato Scientific, Co. Ltd.*, Japón) a 60 °C y otro grupo de ellas se mantuvieron de 20 a 25 °C. Los diferentes componentes de la pruebas inmunocromatográficas en estudio de estabilidad (tanto amplificada como sin amplificar) fueron ensamblados con las partes restantes de este tipo de prueba, que contienen los reactivos biológicos preparados y añadidos en el mismo día. En todos los casos se probó el funcionamiento de las pruebas inmunocromatográficas de un solo paso en 100 µL de plasma con anticuerpos antiAgeHB o sin ellos y una corrida de 20 min a temperatura ambiente.

Análisis estadístico

Los experimentos de optimización de la prueba inmunocromatográfica amplificada y sin amplificar fueron realizados al menos en 2 ocasiones independientes. La lectura visual de ambas pruebas se hizo por al menos dos observadores independientes, sin un conocimiento previo del diagnóstico de la muestra. En la comparación de las pruebas inmunocromatográficas del laboratorio con la prueba comercial se utilizó la determinación del estadígrafo κ de *Cohen* para variables binomiales con el objetivo de demostrar si existe una relación o concordancia entre dos métodos que detectan un mismo analito en muestras dependientes. Ese cálculo se realizó en *Microsoft Excel* (*Microsoft Corporation*, EUA).

Resultados y discusión

Generación del AcM antiAgeHB CBHepB.AgE

Se realizaron dos experimentos de fusiones de linfocitos de animales inmunizados con títulos de anticuerpos antiAgeHB mayor que 1/1000 con mieloma de ratón. Se obtuvieron 4 hibridomas que secretaban anticuerpos de ratón de clase IgG. Ninguno de los anticuerpos reconocieron el antígeno de superficie de HB recombinante.

Sin embargo, todos presentaron reactividad cruzada con el AgcHBr absorbido en la fase sólida y lo reconocieron de igual modo que con el AgeHB. Este resultado fue similar al reportado por Vázquez JE, *et al.*, con 6 AcM antiAgeHB que reconocieron de igual modo a esos dos antígenos recombinantes (AgeHB y AgcHBr) en fase sólida debido a la alta homología que comparten en la secuencia aminoacídica [16]. En la tabla 1 aparecen los resultados de reconocimiento del AgeHB y del AgcHBr a una concentración de 1 µg/mL en solución (a 20 µg/mL -que no es mostrado- ese reconocimiento fue muy similar a 1 µg/mL) en un ensayo inmunoenzimático de competencia para la detección de anticuerpos antiAgeHB. Se discriminaron dos grupos de anticuerpos secretados por esos hibridomas: anticuerpos que reconocieron el AgeHB 2 ó 3 veces menos que el AgcHBr en solución y otro grupo de anticuerpos que reconocieron el AgeHB 2 ó 3 veces más que el AgcHBr en solución. La selección del AcM antiAgeHB que sería incluido en las pruebas inmunocromatográficas de inhibición competitiva para la detección de anticuerpos antiAgeHB se realizó por su forma de reconocer el AgeHB en solución con respecto al reconocimiento del antígeno absorbido en la fase sólida. El AcM secretado por el hibridoma 242/27/6 funcionó de manera similar al AcM antiAgeHB comercial en ese último grupo de anticuerpos al reconocer mejor el AgeHB que el AgcHBr en solución y fue seleccionado como anticuerpo de captura en la prueba inmunocromatográfica. La subclase del AcM secretado por ese hibridoma fue IgG_{2b}. Con ese AcM purificado se realizaron los experimentos posteriores de los dos tipos de pruebas inmunocromatográficas y fue nombrado CBHepB.AgE.

Optimización de la prueba inmunocromatográfica no amplificada

La saturación de la señal roja en la zona de captura específica se alcanza a 1.8 µg del CBHepB.AgE y la intensidad de la mancha en la zona de control de funcionamiento de la prueba no disminuye su coloración. Se logró una buena discriminación de la señal roja de la muestra negativa con respecto a la ausencia de señal en la muestra positiva, por lo que fue esa cantidad de AcM de captura la empleada en los demás

15. Mainet González D, Galván-Cabrera JA, Sorell-Gómez L, Torres-Cabrera MB, Abdo-Cuza A, Castellano-Gutiérrez R y col. Evaluación preliminar de un inmunoenzímico de un solo paso, cualitativo y rápido de troponina I cardiaca en el diagnóstico del infarto agudo del miocardio. *Invest Clin* (2004); 45(3):221-41.

16. Vázquez JE, Palenzuela D; Mussachio A, Acevedo B, Cruz LJ, Gavilondo JV. A visual diagnostic system for Hepatitis B e antigen (HBeAg) based on Mabs. Characterization and preliminary Evaluation. *Advances in Modern Biotechnology* (1999); 5:D26.

Tabla 1. Reconocimiento de los antígenos e (AgeHB) y core (AgcHBr) de Hepatitis B recombinantes en solución o absorción en la fase sólida por los anticuerpos secretados de hibridomas obtenidos en el laboratorio y un anticuerpo monoclonal comercial (AcM) antiAgeHB en un ensayo inmunoenzimático indirecto para la detección de anticuerpos antiAgeHB

Hibridomas	Intensidad de la absorbancia cuando el antígeno está en la fase sólida*		Porcentaje de inhibición de la absorbancia por el antígeno competidor en solución**		Grupos
	AgeHB	AgcHBr	AgeHB	AgcHBr	
25/20/1	xxx	xxx	xx	xxxx	a
26/26/1	xxxx	xxxx	-	xx	a
37/15/2	x	x	-	xxx	a
242/27/6	x	x	xx	-	b
AcM comercial	x	x	xxx	x	b

*Se representa por la absorbancia de 0 a 0.6 (-); de >0.6 a 1.2 (x); de >1.2 a 1.8 (xx); de >1.8 a 2.4 (xxx) y de >2.4 a 3 (xxxx).

**Se muestra el porcentaje de inhibición de 1 µg/mL de antígeno recombinante en solución de 0% a 20% (-); de >20% a 40% (x); de >40% a 60% (xx); de >60% a 80% (xxx) y de >80% a 100% (xxxx).

experimentos de la prueba inmunocromatográfica sin amplificar (Figura 2).

Cuando se aplica 1 µL de volumen de AcP-oro diluido al 50%, en el tampón madre bloqueante y termoestabilizante se obtiene una señal roja débil en la muestra negativa. A partir de aplicar 2 µL de volumen de AcP-oro se obtuvo la saturación de la señal de la muestra negativa y se percibió la inhibición de la señal roja en la línea de captura por la muestra positiva. Además, se logró a ese volumen de conjugado una buena señal en la zona de control de funcionamiento de la prueba y un mayor contraste de la señal roja específica con el fondo más blanco de la nitrocelulosa. En los restantes experimentos se utilizó entre 2 a 2.5 µL de ese reactivo para garantizar la saturación de esa señal, tanto en la prueba inmunocromatográfica amplificada como no amplificada.

Cuando se aplicó entre 100 y 80 ng de AgeHB en la almohadilla macroporosa se obtuvo una buena discriminación entre la desaparición de la señal roja específica de las muestras plasmáticas positivas a anticuerpos antiAgeHB y la aparición de esta señal en las muestras negativas a estos anticuerpos en la prueba inmunocromatográfica sin amplificar. Entre 60 ng a 40 ng de AgeHB, la intensidad de la señal roja en muestras negativas a anticuerpos antiAgeHB fue menor que a 80 ng para desaparecer por debajo de 40 ng. En el resto de los experimentos se utilizó 80 ng de AgeHB en la almohadilla macroporosa, y representó la mínima cantidad de antígeno recombinante que será neutralizado por los anticuerpos antiAgeHB en los plasmas débilmente positivos en la prueba inmunocromatográfica no amplificada.

Optimización de la prueba inmunocromatográfica amplificada

En el ensayo inmunocromatográfico de detección de anticuerpos antiAgeHB amplificado con avidina-biotina se estandarizaron las condiciones de recubrimiento de la avidina en la tira de nitrocelulosa y de la aplicación simultánea de CBHepB.AgE biotinilado y el AgeHB en la almohadilla de conjugado. Se logró un mejor recubrimiento de 2 µg de la avidina en la nitrocelulosa a pH básico con respecto al pH ácido. Ese resultado coincidió con una mayor unión de la avidina a la nitrocelulosa a un pH cercano a su punto isoeléctrico que está alrededor de 10 a 10.6 [17].

En la utilización de la tecnología avidina-biotina debe buscarse la mejor relación de AcM biotinilado que se unirá a la avidina que está en la zona de captura específica, porque un exceso de anticuerpo biotinilado hará que parte de esos anticuerpos no formen complejo con el antígeno y compitan por la unión a la avidina con aquellos que sí formaron complejos con el antígeno. Si la cantidad de anticuerpos biotinilados sin antígeno es mayor que la cantidad de anticuerpos biotinilados con antígeno, entonces se espera que aparezca una señal roja difícilmente perceptible en la zona de captura específica durante la evaluación de muestras negativas a los anticuerpos antiAgeHB. La mejor relación hallada de CBHepB.AgE biotinilado y AgeHB fue entre 100 y 400 ng de AcM biotinilado y entre 40 a 80 ng de antígeno (Figura 3). Por ello, en los demás experimentos se utilizó la relación entre 200 ng de AcM biotinilado y 40 ng de AgeHB. Con este resultado se alcanzó a

neutralizar 40 ng de AgeHB en la almohadilla macroporosa por los anticuerpos antiAgeHB humanos y finalmente, detectar muestras plasmáticas débilmente positivas a estos anticuerpos; lo que aumentó la sensibilidad analítica 2 veces con respecto a la prueba inmunocromatográfica no amplificada.

Comparación de las pruebas inmunocromatográficas elaboradas con un ensayo inmunocromatográfico comercial para detectar anticuerpos antiAgeHB

En la evaluación de las muestras de plasma con una prueba inmunocromatográfica de *Advanced Quality*^{MT} para la detección de anticuerpos antiAgeHB se obtuvieron 23 muestras positivas y 23 negativas a estos anticuerpos. La prueba inmunocromatográfica no amplificada presentó una muestra negativa a los anticuerpos antiAgeHB que fue detectada por el sistema comercial como positiva. El estadígrafo *kappa* de *Cohen* ($kappa = 0.96$) dio un valor entre 0.8 a 1.0, que se interpreta como una concordancia casi perfecta [18] entre la prueba inmunocromatográfica no amplificada desarrollada en el laboratorio con la prueba comercial en la evaluación de esos dos grupos de muestras positivas y negativas a la presencia de anticuerpos antiAgeHB. Esa muestra discordante fue analizada en esa prueba no amplificada con la adición de 0.25% a 10% (p/v) de los polímeros *PEG 8000* y *Kucell* como agentes bloqueantes de inespecificidad y no fue eliminada la señal roja. El sistema inmunocromatográfico amplificado fue completamente igual al comercial con la evaluación de esos dos grupos de muestras (Figura 4), lo cual sugirió una posible falta de sensibilidad de la prueba inmunocromatográfica no amplificada con respecto a la amplificada ya que en la primera debe neutralizarse más antígeno recombinante (80 ng) que en la segunda (40 ng) para la misma cantidad

17. Oliver C. Use of immunogold with silver enhancement. In: Javois LC, editor. *Methods in Molecular Biology*, Vol.34. Immunocytochemical Methods and Protocols. New Jersey: Humana Press Inc. (1994). p. 211-328.

18. Looney SW. Statistical Methods for Assessing Biomarkers. In: Looney SW, editor. *Biostatistical Methods*. New Jersey: Humana Press Inc. (2002). p. 81-110.

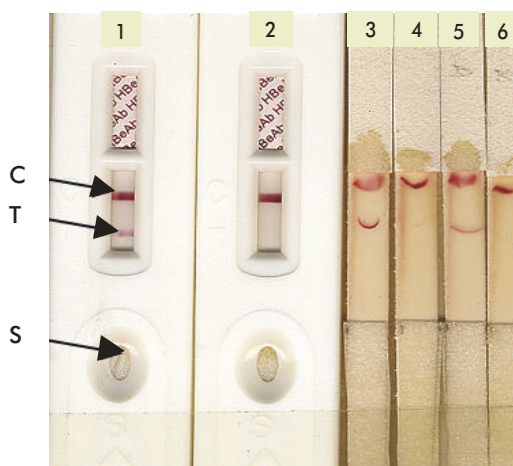


Figura 4. Evaluación en una prueba inmunocromatográfica *Advanced Quality* para la detección de anticuerpos antiAgeHB (1 y 2) y en las pruebas inmunocromatográficas desarrolladas en el laboratorio sin (3 y 4) y con amplificación de avidina-biotina (5 y 6) de una muestra de plasma negativa (1, 3 y 5) y otra positiva (2, 4 y 6) para los anticuerpos antiAgeHB. S es el pozo donde se aplica la muestra de plasma, T es la zona de señal específica y C es la zona de control de funcionamiento de la prueba.

de anticuerpos antiAgeHB presentes en esa muestra. La otra posible explicación es que no se favorezca en la prueba inmunocromatográfica amplificada la interacción inespecífica entre el CBHepB.AgE biotinilado con el AcPc-oro y sí, en la prueba inmunocromatográfica no amplificada de ese conjugado con el AcM no biotinilado. En esta segunda prueba la utilización de 1 800 ng de CBHepB.AgE no biotinilado/2 µL representó 9 veces mayor cantidad del mismo anticuerpo que en la primera prueba, donde se aplicó 200 ng de CBHepB.AgE biotinilado/2 µL.

Interferencia de algunos compuestos bioquímicos del plasma en estas pruebas inmunocromatográficas

Las formas nativas del AgeHB y el AgcHB tienen una similitud estructural de 149 aminoácidos, pero son antigénicamente diferentes [19]. Es decir, los anticuerpos antiAgeHB generados en pacientes con Hepatitis B no reconocen la proteína nativa del AgcHB y los anticuerpos antiAgcHB en un paciente enfermo con esta infección viral tampoco reconocen la proteína nativa del AgeHB. El AgeHB es una proteína liberada al torrente sanguíneo durante la fase replicativa del virus. Sin embargo, el AgcHB de este virus es una proteína muy inmunogénica que es retenida en su mayor parte dentro de la célula para formar las nucleocápsidas de viriones inmaduros. En este trabajo, el proceso de selección de los AcM antiAgeHB fue realizado con las proteínas recombinantes del AgeHB y del AgcHB y como se analizó previamente, existe reactividad cruzada del AcM CBHepB.AgE con el AgcHB en solución y absorbido en la fase sólida, por lo cual es importante estudiar si existe interferencia de los anticuerpos plasmáticos antiAgcHB en estas pruebas inmunocromatográficas desarrolladas en el laboratorio. Las dos pruebas inmunocromatográficas del laboratorio dieron señal roja indicativa de ausencia de anticuerpos antiAgeHB en las 5 muestras de plasma, que no tenían anticuerpos antiAgeHB y sí, anticuerpos antiAgcHB en la prueba múltiple comercial. Ese resultado sugirió la ausencia de interferencia de los anticuerpos antiAgcHB humanos en estos dos ensayos inmunocromatográficos desarrollados en el laboratorio. También se corroboró que los anticuerpos plasmáticos humanos antiAgcHB no atrapan al AgeHB a pesar de su similitud estructural aminoacídica con el AgcHB y que esos anticuerpos se unen principalmente a epítomos conformacionales producidos por el plegamiento y el ensamblaje espontáneo de varias proteínas de core entre sí para formar partículas de 27 nm [2].

En la almohadilla macroporosa de la prueba inmunocromatográfica amplificada del laboratorio se aplica el AcM CBHepB.AgE biotinilado conjuntamente con el AgeHB, que luego será atrapado en la zona de captura de la nitrocelulosa por la avidina. La biotina es una vitamina hidrosoluble que participa en el metabolismo del organismo humano. Esa vitamina adquirida de los alimentos está presente en la sangre de los seres humanos y puede interferir en la unión del anticuerpo biotinilado a la avidina absorbida en la tira de nitrocelulosa. Por ello, fue de interés conocer qué concentraciones plasmáticas de esa vitamina repercutían en el funcionamiento de esta prueba. La prueba inmunocromatográfica amplificada para la detección de

anticuerpos antiAgeHB no produjo una señal roja en la zona de captura específica, cuando 100 ng/mL de biotina fue añadida a la muestra plasmática negativa a anticuerpos antiAgeHB, es decir, esa concentración de vitamina inhibió la señal roja que debía aparecer en esa prueba para esa muestra sin anticuerpos antiAgeHB. Sin embargo, a esa muestra negativa a anticuerpos antiAgeHB cuando se le añadió 20 ng/mL de biotina, sí apareció una señal roja que indicaba la ausencia de anticuerpos antiAgeHB. En los dos casos la muestra positiva a anticuerpos antiAgeHB no dió señal roja en la zona de captura específica. Este experimento mostró que este ensayo inmunocromatográfico amplificado no tiene interferencia de la biotina hasta una concentración de 20 ng/mL en el plasma, que corresponde a una concentración 20 veces mayor que las concentraciones terapéuticas de esta vitamina [20].

El interferón alfa 2b es un medicamento empleado en el tratamiento de las Hepatitis B crónicas, por lo que debe investigarse si puede interferir en la determinación de anticuerpos antiAgeHB. En estos ensayos no existió interferencia del interferón alfa 2b recombinante a 20 ng/mL y 100 ng/mL, tanto en la muestra negativa como positiva a los anticuerpos antiAgeHB. Esas concentraciones añadidas son 500 veces mayores que las detectadas en un estudio farmacocinético aleatorizado y a doble ciegas realizado con 24 voluntarios sanos a quienes se les inyectó una dosis única de 10×10^6 UI de Intron A y Heberon alfa R (dos formulaciones de interferón alfa-2b humano recombinante) con los valores máximos de actividad sérica a las 5 y 7 h para Intron A y Heberon alfa R, respectivamente [21].

La heparina es un mucopolisacárido sulfurado con presencia de grupos de sulfatos y carboxilos en cada unidad de disacárido, lo cual hace que sea fuertemente polianiónica en solución [22]. Esta molécula es sintetizada en el organismo por los mastocitos, pero también es usada como anticoagulante de las muestras de sangre en el laboratorio para la obtención de plasma. Como la heparina está cargada negativamente puede interferir en la unión de la partícula de oro (cargada negativamente) a la poli-L-lisina (cargada positivamente) en la zona de control de funcionamiento de la nitrocelulosa de las dos pruebas inmunocromatográficas y a la avidina (que puede estar cargada positivamente) durante la migración del plasma a pH neutro en la zona de captura específica de la prueba inmunocromatográfica amplificada. La heparina a 2 UI/mL y 10 UI/mL en el plasma impidió la aparición de la señal roja en la poli-L-lisina recubierta en la nitrocelulosa cuando migra por esa zona el AcP-oro en los dos tipos de pruebas inmunocromatográficas, tanto para las muestras positivas como negativas a anticuerpos antiAgeHB. El efecto de la heparina en las dos concentraciones usadas sobre la avidina (2 µg) no provocó desaparición de la señal roja en la prueba inmunocromatográfica amplificada y existió una buena diferenciación entre las muestras positivas y negativas a los anticuerpos antiAgeHB. Esas concentraciones de heparina correspondieron a las usadas en el laboratorio como anticoagulante (2 UI/mL) y 5 veces mayor [13]. Esas 2 concentraciones de heparina no influyeron en la desaparición de la señal roja en la zona de control de funcionamiento de las pruebas

19. Hoofnagle JH. Chronic Hepatitis B [edit.]. *New England Journal Medicine* (1990); 323 (5):337-9.

20. Collison PO, Gerhardt W, Katus HA, Müller-Bardoff M, Braun S, Schricke U et al. Multicentre evaluation of an immunological rapid test for the detection of troponin T in whole blood samples. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* (1996); 34:591-8.

21. Rodríguez JL, Valenzuela C, Marín N, Ferrero J, Ducongé J, Castillo R et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of two recombinant human interferon alpha-2b formulations administered intramuscularly in healthy male volunteers. *Biotecnología Aplicada* (2000); 17 (julio-septiembre):166-70.

22. David JR, Goetzl EJ, Austen KF. Inmunología. En: Smith LH y Their SO, editores. *Fisiopatología: principios biológicos de la enfermedad*. Ciudad de La Habana: Editorial Científico-Técnica (1983). p. 138-217.

inmunocromatográficas cuando fue recubierta por anti-inmunoglobulinas G de ratón en carnero. Concluyendo, la sustitución de poli-L-lisina por anti-inmunoglobulina G de ratón en carnero en la zona de control de funcionamiento hace posible la utilización de la heparina como anticoagulante de sangre de ambas pruebas. Ese anticuerpo anti-inmunoglobulina G de ratón ha mostrado ser estable entre 1 ó 2 años en los experimentos de estabilidad acelerada de una prueba inmunocromatográfica con una especificidad diferente [15].

Termoestabilidad acelerada de los diferentes reactivos biológicos usados en las pruebas inmunocromatográficas desarrolladas en el laboratorio

Los estudios de estabilidad acelerada térmica predicen un posible intervalo de tiempo en que los componentes de la prueba inmunocromatográfica en sus diferentes formulaciones pueden ser conservados a temperatura ambiente sin afectar la calidad de esa prueba. De ningún modo sustituyen el estudio a tiempo real de la estabilidad de esos componentes a una temperatura entre 20 a 25 °C; sin embargo, ayudan a orientar al investigador para identificar con ahorro de tiempo y recursos de antemano, qué formulación de las probadas garantizaría la conservación de los componentes de la prueba inmunocromatográfica. Se plantea que una estabilidad a 60 °C durante 3 días de un componente o de la prueba inmunocromatográfica completa equivale a un tiempo real entre 8 a 12 meses a temperatura ambiente y durante 5 días equivale entre 12 meses y 18 meses [23].

En la prueba inmunocromatográfica sin amplificar se estudiaron el CBHepB.AgE y el AcP-oro. El CBHepB.AgE (1.8 µg) recubierto en la nitrocelulosa fue estable a 60 °C con trehalosa 8% a los 3 y 5 días. Se utilizó como diluyente final del AcM de recubrimiento igepal 0.05% y trehalosa 8% en los demás experimentos. El AcP-oro aplicado en el material macroporoso con su diluyente ½ fue estable con trehalosa 10% y 20% a los 3 y 5 días (Figura 5), por tanto, la trehalosa 10% en el diluyente del conjugado fue utilizada en los demás experimentos.

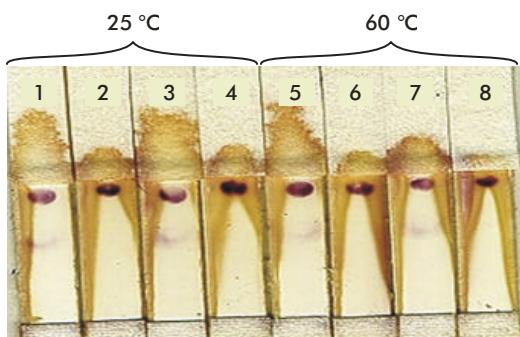


Figura 5. Termoestabilidad acelerada del conjugado anticuerpo policlonal-oro antiantígeno e de Hepatitis B (antiAgeHB) a 25 °C y a 60 °C durante 5 días en una prueba inmunocromatográfica sin amplificar para la detección de anticuerpos antiAgeHB. Las pruebas inmunocromatográficas 1, 3, 5, 7 fueron introducidas en una muestra de plasma sin anticuerpos antiAgeHB y las tiras 2, 4, 6 y 8 en una muestra de plasma con anticuerpos antiAgeHB.

En la prueba inmunocromatográfica amplificada se estudiaron el recubrimiento con avidina en la nitrocelulosa y la aplicación simultánea del AcM biotinilado con el AgeHBr en la almohadilla macroporosa. La avidina fue estable con trehalosa 5 y 10% a 60 °C durante 3 y 5 días, donde las muestras positivas no daban señal y las muestras negativas daban una señal roja comparable con las tiras conservadas a temperatura ambiente. El recubrimiento de la prueba con avidina al 0% de trehalosa daba señal roja al evaluar una muestra negativa a anticuerpos antiAgeHB, pero menos intensa que el control a temperatura ambiente, por ello, la formulación empleada finalmente para la avidina contenía trehalosa 5%. El CBHepB.AgE biotinilado y el AgeHBr fueron estables con trehalosa 8% a los 3 y 5 días. Con 4% de trehalosa esos componentes no fueron estables durante 5 días, porque no se obtenía una señal roja en la muestra negativa de anticuerpos antiAgeHB. A causa de ese resultado se utilizó la concentración 8% de trehalosa en el diluyente del AcM biotinilado y de AgeHBr de la prueba inmunocromatográfica amplificada y solamente del AgeHBr en la prueba inmunocromatográfica no amplificada. Las concentraciones de trehalosas que garantizan la estabilidad de los reactivos biológicos utilizados en estos inmunoensayos oscilaron entre 5 y 10%, las cuales coincidieron con las obtenidas en otra prueba inmunocromatográfica desarrollada en el laboratorio con la especificidad diferente de detectar troponina I cardíaca en plasma [15] y fueron menores que la reportada en una prueba inmunocromatográfica para la detección de *Salmonella Typhimurium* donde la concentración de trehalosa de la formulación del compuesto bioquímico liofilizado en el material macroporoso llegó a 24% [24].

En la patofisiología de la Hepatitis viral B se distinguen tres fases: la fase de tolerancia inmune, la fase de aclaramiento inmune y la fase de portador inactivo residual [1]. En la fase de tolerancia aparecen el antígeno de superficie del HB, el AgeHB, concentraciones séricas normales de transaminasas hepáticas y altos niveles de carga genética viral (>10⁵ copias/mL). En la fase de aclaramiento inmune se mantiene alta la carga genética viral, pero aumentan las concentraciones séricas de transaminasas hepáticas y el punto final de esta etapa es indicado por la desaparición sérica del AgeHB y la aparición de anticuerpos antiAgeHB. Posteriormente se pasa a la fase final de portador inactivo residual donde la carga genética viral disminuye a menos de 10⁴ copias/mL y las concentraciones de transaminasas hepáticas disminuyen. Se plantea que la desaparición sérica del AgeHB y la aparición de los anticuerpos antiAgeHB ocurre espontáneamente entre el 50-70% de los pacientes con HB crónica y no ocurre así cuando son seleccionadas mutantes del VHB. En ese último caso, se originan Hepatitis B crónicas AgeHB negativas en los pacientes con presencia de anticuerpos antiAgeHB séricos que evolucionan con aumentos persistentes o transitorios de la carga genética viral y de las concentraciones séricas de las transaminasas hepáticas [25]. Se puede ver la importancia de la aparición de los anticuerpos antiAgeHB conjuntamente con la desaparición sérica del AgeHB en marcar una fase evolutiva en más de la mitad de los pacientes con HB crónica. Y también esos dos mar-

23. Gunter RG, Rational use of polymers, surfactants in dry reagent test systems. Course about theory and practice of rapid immunodiagnostic test. Milan, Italy: Biotod and Schleicher & Schuell. May 12-13, 1999.

24. Se Hwan P, Seung Hwa L, Joung-Hwan C, Young-Sang K. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. *Methods* (2000); 22:53-60.

cadore inmunológicos pueden ser indicadores de un pronóstico favorable en los pacientes que han respondido al tratamiento antiviral e inmunomodulatorio. Por lo que, se han utilizado para evaluar el éxito de ensayos clínicos con diferentes combinaciones de agentes antivirales en los pacientes con HB crónica AgeHB positiva [3, 25].

Conclusión

Conociendo la información que puede aportar la detección de anticuerpos antiAgeHB en los estudios de ensayos clínicos de agentes terapéuticos para el tratamiento de pacientes con HB crónica AgeHB positiva, se desarrolló en el laboratorio un sistema inmunocromatográfico para la detección de anticuerpos antiAgeHB en plasma. Se estudiaron dos formatos: uno amplificado con avidina-biotina y otro sin amplificar. Los resultados obtenidos sugirieron la posibilidad de desarrollar un sistema inmunocromatográfico bajo las condiciones de laboratorio para la detección de anticuerpos antiAge-HB en plasma

con anticoagulantes de citrato de sodio, heparina y EDTA. La avidina-biotina usada en la prueba inmunocromatográfica amplificada mejoró la sensibilidad analítica al aplicarse menor cantidad de AgeHB a neutralizar que en la no amplificada. La avidina puede utilizarse en los ensayos inmunocromatográficos competitivos de un solo paso para la detección de anticuerpos antiAgeHB en plasma, a pesar de su carga iónica y la presencia de carbohidratos en su estructura, sin afectar las características de realización de estos ensayos (especificidad, sensibilidad, rapidez, sencillez) y aportar una posibilidad más económica que la aplicación de la estreptavidina con la biotina.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Dra. C. María E Fernández por sus sugerencias en la revisión del artículo y a Dunia Gómez de la División de Ensayos Clínicos del CIGB por suministrar el ingrediente farmacéutico activo de interferón alfa 2b. Este trabajo ha sido posible por la financiación del Estado de Cuba.

25. Yun-Fan L. Hepatitis Flares and Hepatitis B e Antigen Seroconversion: Implication in Anti-Hepatitis B Virus Therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatolog* (2003); 18:246–52.

Recibido en marzo de 2007. Aprobado en octubre de 2007.