
Desarrollo de un ensayo enzimático para la determinación de anticuerpos IgM anti-cápside del virus de la Hepatitis B.

Nathalie Uzcátegui¹, José Flores², Ferdinando Liprandi¹ y Flor H. Pujol¹.

¹ Laboratorio de Biología de Virus, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) e

² Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Hepatitis B, IgM anticore, inmunodiagnóstico.

Resumen. La determinación de anticuerpos IgM anti-cápside (anti-AgCHB) del Virus de la Hepatitis B (VHB) es de gran utilidad para la identificación de infecciones agudas por este virus. El objetivo de este estudio fue el desarrollar un sistema inmunodiagnóstico para la detección de anticuerpos IgM anti-AgCHB. Para la realización del ensayo fue necesaria la producción del AgCHB recombinante expresado en *Escherichia coli*. Una vez obtenido y purificado el antígeno se procedió a estandarizar y evaluar el ensayo. Un ELISA sandwich de captura resultó ser el óptimo para la detección de anticuerpos IgM anti-AgCHB. Se realizó entonces la evaluación de 110 sueros humanos a través de dos ensayos inmunodiagnósticos, el inmunoensayo diagnóstico desarrollado y un estuche comercial. El inmunoensayo desarrollado arrojó una alta sensibilidad (99%) y especificidad (93%) al compararlo con el estuche comercial. Los resultados obtenidos permitieron evidenciar la utilidad del sistema de determinación de anticuerpos IgM anti-AgCHB como marcador serológico de una infección causada por el VHB, en particular en áreas endémicas de Sur América.

An enzyme immunoassay for detection of Hepatitis B virus IgM anti-core antibodies.

Invest Clin 1998; 39(1): 19-28.

Key words: Hepatitis B, IgM anticore, immunodiagnosis.

Abstract. Detection of IgM anti-core (anti-HBcAg) antibodies of Hepatitis B Virus (HBV) is an useful marker for hepatitis B virus (HBV) acute infection.

The aim of this study was to perform an immunodiagnostic assay for the detection of IgM anti-HBcAg antibodies. Hepatitis B core antigen (HBcAg) was produced by a recombinant clone of *Escherichia coli* and used for the development of the immunoassay. An IgM capture enzyme immunoassay (EIA) was selected for the detection of IgM anti-HBcAg antibodies. A total of 110 human plasma or sera were tested by the capture EIA and a commercial assay. The capture EIA yielded 99% of sensitivity and 93% specificity, when compared with the commercial test. The capture EIA developed here is of interest for epidemiological studies, particularly for endemic regions in South America.

Recibido: 17-7-97. Aceptado: 15-1-98.

INTRODUCCIÓN

El virus de la Hepatitis B (VHB) es un problema de salud pública presente en todo el mundo. El número de portadores del virus excede los 300 millones (1). Las pruebas serológicas han documentado la existencia de Hepatitis B en todo el mundo, incluyendo las áreas más remotas y aisladas. La verdadera prevalencia de la enfermedad se conoce sólo en forma aproximada ya que existen registros inadecuados, no comprobados por pruebas de laboratorio, realizados a veces con ensayos no sensibles, y con sesgo de selección. Sin embargo es bien conocido que la tasa de portadores del AgsHB varía de país en país, con las más altas tasas reportadas para países en desarrollo con facilidades médicas limitadas. En Venezuela este agente afecta entre un 1-5 % de la población, con secuelas de cirrosis hepática, con posible cronicidad de la enfermedad y en último término la formación de carcinoma primario hepatocelular (2,3). En los países en desarrollo, los estudios epidemiológicos se han visto limitados por

el alto costo de estuches comerciales para su diagnóstico.

La determinación de anticuerpos IgM anticápside del VHB (IgM anti-AgcHB) es de gran utilidad para la identificación de infecciones agudas causadas por este virus (1, 4, 5, 6, 7-11). Es por ello que el objetivo principal de este estudio fue el desarrollar un sistema inmunodiagnóstico que permitiera detectar anticuerpos IgM anti-AgcHB del VHB, diferenciando de esta forma una infección reciente de una infección pasada causada por el VHB y a la vez que permitiera disponer de un sistema desarrollado en el laboratorio que podría sustituir la importación de estuches de diagnóstico comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y purificación del antígeno recombinante

El AgcHB se obtuvo a través del crecimiento de la bacteria recombinante *Escherichia coli* pCRL2411 (gentilmente cedida por el Dr. Yury Khudyakov, del CDC de Atlanta, USA). La bacteria fue crecida en me-

dio LB a 30 °C y se indujo la expresión del AgcHB aumentando la temperatura a 40 °C. La purificación del antígeno se logró a través de la clarificación de éste último, centrifugando a 120000 g durante 16 horas, para luego someterlo a ultracentrifugación en gradiente de sacarosa 20%-60% a 12000 g durante 5 horas. La preparación del AgcHB se analizó mediante ELISA indirecto, sensibilizando una placa de ELISA (Inmunolon 2) con cada una de las fracciones del gradiente de sacarosa durante 3-4 horas; luego se incubó con leche descremada al 5% durante 2 horas; se incubó con un anticuerpo monoclonal (AcM) 2E11 anti-AgcHB (12) a una dilución de 1/1000 en leche descremada al 1%. Luego se incubó con una anti-inmunoglobulina de ratón conjugada a peroxidasa durante 1 hora (1/1000 en PBS). Se reveló con el sustrato OPD (1/100) en buffer citrato-fosfato-perborato. La reacción se detuvo a los 30 minutos con H₂SO₄, 1 mol/L. La densidad óptica (D.O.) fue determinada a 492 nm en un espectofotómetro Multiskan II Version 2.01 (Flow Laboratories Inc; VA, USA). Cada incubación se hizo a 37°C y luego de cada paso, 4 lavados con PBS-Tween fueron realizados. Se realizó también, una electroforesis en geles verticales desnaturalizantes de poli(acrilamida) 10% (PAGE-SDS), según el método de Laemmli, 1970 (13). Los geles de poli(acrilamida) se tiñeron con azul brillante de coomassie R-250. Con el fin de estimar la masa relativa y el grado de pureza del AgcHB obtenido se realizó un estudio de densitometría digitalizando el gel de poli(acrilamida) a

través del programa Quick Scan, version 3.0. Las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa, que contenían el AgcHB purificado fueron unidas y sometidas a electrotransferencia con revelado inmunológico (14), usando el AcM 2E11. Igualmente, el AgcHB producido y purificado también se incubó durante 1 minuto en rejillas de cobre, de 400 mesh y se coloreó con acetato de uranilo al 2% durante 1 min., para su observación en el microscopio electrónico (CCM10. Phillips, Microscopio Electrónico de Transmisión PW6020). Finalmente, el AgcHB fue conjugado a biotina de acuerdo a una metodología descrita anteriormente (2).

Desarrollo del Ensayo Inmuno-diagnóstico.

Se ensayaron dos tipos de ELISA para determinar el método mas apropiado para el inmunodiagnóstico de anticuerpos IgM anti-HBc.

ELISA Indirecto: Se sensibilizó una placa de ELISA (Inmunolon 2, poliestireno) con el AgcHB durante 3-4 horas; luego se incubó con leche descremada 5% durante 2 horas; se incubó con los sueros humanos positivos y negativos a una dilución de 1/10 en PBS IX durante 1 hora. Luego se colocó un anti-IgM conjugado a peroxidasa (KPL) durante 1 hora (1/1000 en PBS). Se reveló con el sustrato OPD (1/100) en buffer citrato-fosfato-perborato. La reacción se detuvo a los 30 minutos con H₂SO₄, 1 mol/L. La densidad óptica (D.O.) fue determinada a 492 nm en un espectofotómetro Multiskan II Version 2.01 (Flow Laboratories Inc; VA, USA). Cada incubación se hizo a 37°C y lue-

go de cada paso, 4 lavados con PBS-Tween fueron realizados.

ELISA de Captura: Este ensayo consistió en sensibilizar la placa (Inmunolon 2, poliestireno) con un anti-IgM humano (cadena % específico) de origen comercial KPL, a una dilución de 1/1000 durante 3-4 horas; luego se incubó con leche descremada 5% durante 2 horas; posteriormente se incubaron con los sueros humanos a una dilución de 1/10 en PBS durante 1 hora. Se incubó luego con el AgcHB conjugado a biotina a una dilución de 1/10 en buffer 20% SNB, BSA 1% y PBS-Tween 0,05%. Luego se incubó con estreptavidina-peroxidasa durante 1 hora (1/1000 en PBS-Tween). Se reveló con el sustrato OPD (1/100) en buffer citrato-fosfato-perborato. La reacción se detuvo a los 30 minutos con H₂SO₄, 1 mol/L. La D.O. fue determinada a 492 nm en un espectofotómetro Multiskan II Version 2.01 (Flow Laboratories Inc; VA, USA). Cada incubación se hizo a 37°C y luego de cada paso, 4 lavados con PBS-Tween fueron realizados.

Una vez estandarizado el ELISA, se evaluaron 110 sueros humanos provenientes de diferentes partes de Venezuela: sueros IgM anti-HBc negativos pero anti-HBc total positivos del Banco Municipal de Sangre (n= 10) y sueros anti-HBc negativos provenientes de Clínica El Ávila en Caracas (n= 10); sueros IgM anti-HBc positivos provenientes del Laboratorio de Referencia Viroológica de Maracaibo (n= 4), sueros negativos del Laboratorio de Biología de Virus (IVIC) negativos para todos los marcadores de VHB y virus de Hepatitis C (n= 4). El

resto de los sueros corresponden a pacientes provenientes del Instituto Nacional de Higiene (INH), tomados de 1 a 2 meses de presentarse la sintomatología de hepatitis aguda, eran AgsHB y AgcHB positivos (n= 82) y fueron evaluados a través de la prueba comercial de Abbott (CORZYME-M, Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois, USA) y del ensayo inmunodiagnostics propuesto. El 78,05% de las muestras (n= 64) provenientes del INH de las muestras resultaron IgM anti-HBc positivas.

RESULTADOS

Obtención y purificación del antígeno de la nucleocápside del VHB

A través del crecimiento de la bacteria recombinante de *Escherichia coli* pCRL2411, se logró producir el antígeno de la nucleocápside del VHB (AgcHB), obteniéndose 1,75 mg de AgcHB a partir de 1,5 litros de cultivo bacteriano. Los análisis de densitometría realizados a través del programa Quick Scan versión 3.0 señalaron una pureza del AgcHB de 68,84% y una masa relativa de 23500 daltons, que corresponden a un peso molecular similar al señalado en la literatura (1, 15, 16). En el gel de poliacrilamida (Fig. 1Aa) se observa en el carril que corresponde al AgcHB puro, la presencia de otras bandas de mayor peso molecular. El Western Blot realizado señala que éstas corresponden a impurezas bacterianas y no a posibles dímeros del AgcHB (Fig. 1Ab). En efecto, estas bandas no fueron reconocidas por el AcM 2E11. Por otra parte, si bien esta inmunopresión

muestra cierta inespecificidad del Mab 2E11, también señala la presencia de una sola banda en el carril que corresponde al AgcHB puro. El AgcHB recombinante expresado en *E. coli* tiene la habilidad de autoensamblarse en una pseudopartícula viral (15). La microscopía electrónica reveló partículas esféricas de 22 nm aproximadamente (Fig. 1B).

Desarrollo del Ensayo Inmunodiagnóstico

El ELISA Indirecto, que consistió en adsorber a la microplaca el AgcHB, añadir luego los sueros humanos y revelar con conjugado anti-IgM humana-peroxidasa, arrojó una alta inespecificidad, por lo que se descartó como inmunoensayo (datos no mostrados). El ELISA de captura permitió determinar una mayor diferencia entre los sueros positivos y negativos y un relativo bajo valor de fondo para los pozos control, por lo que se escogió éste como prueba inmunodiagnóstica.

Un total de 68 sueros positivos y 24 sueros negativos para IgM anti-HBc fueron evaluados mediante el ELISA de captura. A pesar de que el ensayo comercial de Abbott presentó una mayor amplitud entre los sueros positivos y el valor umbral, el ensayo propuesto presentó una resolución adecuada (Fig. 2). De hecho, el ensayo arrojó una alta sensibilidad (99%) y especificidad (100%) (Tabla I). Un solo paciente IgM anti-HBc positivo no fue detectado mediante el ELISA de captura. De los 14 sueros de pacientes remitidos por el INH como cursando una hepatitis aguda a VHB y negativos para IgM anti-HBc según el ensayo comercial, 3 resultaron po-

sitivos por el ELISA de captura desarrollado. La probabilidad de que estas muestras resultaran falsos positivos para IgM anti-HBc, dada la presencia de anticuerpos de tipo IgG anti-HBc en ellas resulta escasa, dado que 10 muestras anti-HBc total positivas e IgM anti-HBc negativas provenientes del Banco Municipal de Sangre resultaron negativas en el ELISA de captura.

DISCUSIÓN

Considerando la importancia del VHB y tomando en cuenta que el diagnóstico en Venezuela depende de estuches importados, se desarrolló un ensayo inmunodiagnóstico para detectar anticuerpos IgM dirigidos contra el AgcHB. El anticuerpo IgM aparece a altas concentraciones sólo durante la fase aguda de la enfermedad, indicando una infección reciente, incluso cuando no son detectables los niveles de AgcHB (1, 4, 5, 6, 7-11).

A través del crecimiento de la bacteria recombinante *E. coli* pCRL2411 se logró producir el AgcHB para su utilización en el desarrollo de ensayos inmunodiagnósticos. Las referencias bibliográficas sobre la obtención de AgcHB recombinante señalan su utilización en ensayos inmunodiagnósticos sin realizar purificación alguna, es decir, utilizando sólo extractos crudos de lisados de la preparación bacteriana. Stahl y col. 1982 (15) señalan que aún con el extracto crudo de la preparación bacteriana lisada del AgcHB, la incidencia de falsos positivos en ensayos inmunodiagnósticos es baja. Sin embargo, Roggendorf

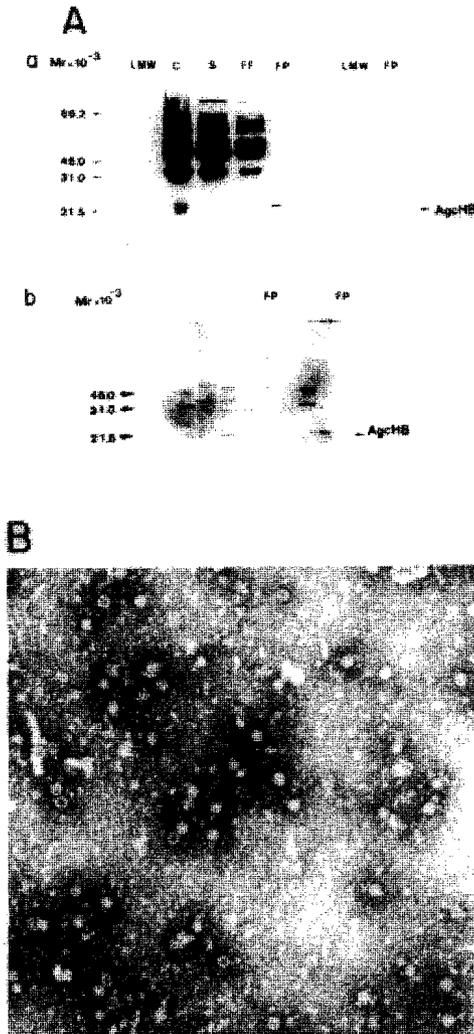


Fig. 1A. Inmunoimpresión (Western-Blot) de las diferentes etapas de purificación del AgcHB. Parte superior: Electroforesis en gel de poliacrilamida a partir del cual se realizó la electrotransferencia. Parte inferior: Western-Blot. Los carriles corresponden como sigue: LMW: pesos moleculares de referencia. C: preparación bacteriana antes de la purificación. S: preparación bacteriana luego de la cosecha. FF: fase fluida obtenida durante la clarificación. FP: Fracción purificada del AgcHB. En el carril FP de la parte A inferior se observa el reconocimiento del AcMo 2E11 a una sola banda de la preparación final del AgcHB. 1B. Microscopía electrónica del AgcHB purificado. La barra indica 100 nm.

y col. (4) señalan que se ha comprobado que altas concentraciones de antígenos semipurificados pueden llevar a reacciones no específicas con sueros negativos, dadas las impurezas de las preparaciones de éste.

La masa relativa para el AgcHB (determinada a través de la densitometría sobre los geles de poliacrilamida) de 23.600 daltons, es similar a la señalada en la bibliografía (21.500 daltons) (1, 16). Un valor más cercano (22.000 daltons) fue obtenido al estimar el peso molecular del AgcHB según las distancias de migración de las bandas del antígeno respecto a las bandas de referencia de peso molecular. La tinción con acetato de uranilo al 2% de la preparación bacteriana

purificada reveló la presencia de partículas esféricas, correspondientes al AgcHB, de aproximadamente 28 nm, lo cual corresponde al tamaño señalado en la literatura (1, 16). En resumen, se logró producir y purificar el AgcHB recombinante en cantidad y grado de pureza adecuados para su uso en ensayos inmunodiagnósticos de interés de salud pública. Este AgcHB ha sido utilizado igualmente en ensayos de inhibición para la determinación de anticuerpos totales anti-AgcHB (12), resultando adecuado para este ensayo (datos no mostrados).

Habiendo obtenido este antígeno, se evaluaron distintos inmunoensayos para la determinación de anti-

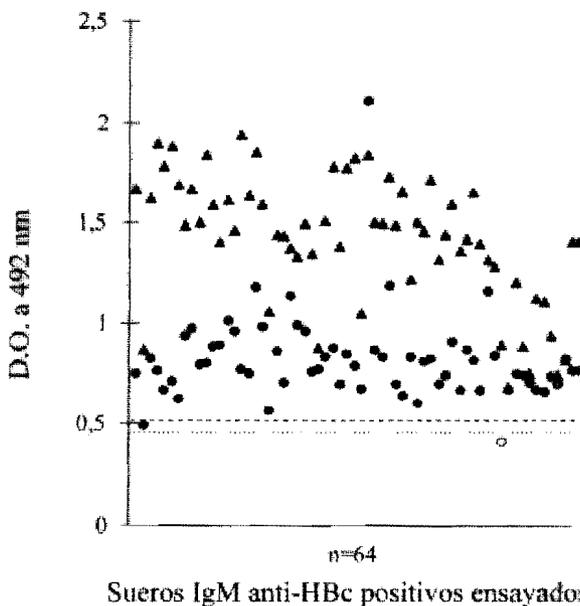


Fig. 2. Evaluación de los sueros IgM anti-HBc a través de la prueba comercial (para los sueros positivos) y del ensayo propuesto (para los sueros positivos y para un suero negativo). El valor umbral del ensayo de captura corresponde a la media del valor obtenido con 3 sueros negativos más tres desviaciones estándar (.....:0,472). Valor umbral de la prueba comercial (-.-.: 0,508).

cuerpos IgM dirigidos contra la cápside del VHB (anticuerpos IgM anti-HBc). Un ELISA de captura resultó ser eficiente como inmunoensayo en la detección de anticuerpos IgM anti-HBc en sueros infectados. Una vez estandarizadas las condiciones óptimas para el ELISA doble sandwich se procedió a evaluar el inmunoensayo. La prueba de diagnóstico comercial (Abbott) mostró una mayor resolución respecto al ensayo inmunodiagnóstico desarrollado (Fig. 2), lo que indica que sería beneficioso el mejorar las condiciones del inmunoensayo desarrollado, para lograr una mayor amplitud entre los valores de los sueros positivos y negativos a evaluar. Es importante considerar, sin embargo, la alta eficiencia de la prueba comercial, dada la utilización de microperlas que cubren una mayor superficie expuesta a anticuerpos *versus* la base plana de un pozo de una placa de ELISA. Sin embargo, el ensayo propuesto arrojó unos resultados altamente satisfactorios desde el punto de vista de sensibilidad y especificidad (Tabla I).

Otro aspecto importante a destacar es que los 3 pacientes presuntos falsos positivos pertenecieron todos al grupo de sueros con hepatitis aguda del INH, los cuales resultaron ser positivos (evaluados por la prueba co-

mercial Abbott) para anticuerpos totales contra el AgcHB. La posibilidad de que el inmunoensayo desarrollado esté detectando en realidad anticuerpos IgG anti anti-AgcHB y no IgM parece descartable ya que no fueron reconocidos 10 sueros de donantes IgG anti-AgcHB positivos, IgM negativos. Se puede especular que estos pacientes poseen niveles basales de anticuerpos IgM anti-HBc, por lo que no son detectados por el umbral de positividad de una prueba comercial ajustada a niveles de IgM de hepatitis aguda, obviando pacientes que puedan presentar una hepatitis crónica. Se ha descrito en efecto que un valor positivo de anticuerpos IgM anti-HBc no excluye una enfermedad crónica de hígado causado por VHB. Por esta razón las pruebas inmunodiagnósticas comerciales han adecuado un umbral de positividad para no detectar pacientes con una hepatitis crónica y que presentan niveles basales de anticuerpos IgM anti-HBc (17, 18). Sin embargo, la adecuación de este umbral parece estar generando a su vez falsos negativos en la población de pacientes con hepatitis aguda a VHB y algunos de estos posibles falsos negativos parecen haber sido reconocidos por el ensayo desarrollado en este estudio.

En este sentido es importante

TABLA I
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL ENSAYO INMUNODIAGNÓSTICO
DESARROLLADO UTILIZANDO EL AGCHB RECOMBINANTE OBTENIDO

Sueros	n	Ensayo de captura	Correlación
Anti-HBc+	69	68	Sensibilidad 99%
Anti-HBc-	40	37	Especificidad 93%

ahondar en la evaluación del inmu-noensayo desarrollado mediante el seguimiento de la respuesta serológica de pacientes en la fase aguda, así como el estudio de pacientes con hepatitis crónica, con el fin de ajustar, si resultase necesario, el umbral de positividad de la prueba. En conclusión se logró desarrollar una prueba inmunodiagnóstica de alta sensibilidad y especificidad para la determinación de anticuerpos IgM anti-HBc en sueros infectados utilizando un AgcHB recombinante producido y purificado en el laboratorio, constituyendo esto una alternativa para estudios epidemiológicos en Venezuela y en áreas endémicas de Sur América.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de Abbott Diagnostics quien proporcionó los ensayos diagnósticos requeridos para este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- HOLLINGER F.B.: Hepatitis B Virus. En: Fields, B.N, Knipe, D.N. Virology. 3a Edición. New York: Raven Press, Ltd.,1996. p.2171-2236.
- 2- PUJOL F., RODRIGUEZ I., LI-PRANDI F.: Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B. Acta Cient Venez 1992; 43:235-239.
- 3- PUJOL F., RODRIGUEZ I., DEVESA M., RANGEL-ALDAO R., LIPRANDI F.: A double sandwich monoclonal enzyme immunoassay for detection of Hepatitis B surface antigen. J Immunoass 1993; 14:21-31.
- 4- ROGGENDORF M., DEINHARDT F., FROSNER G., SCHIED R., BAYERL R., ZACHOVAL R.: Immunoglobulin M Antibodies to Hepatitis Core Antigen: Evaluation of Enzyme Immunoassay for Diagnosis of Hepatitis B Virus Infection. J Clin Micr 1981; 13:618-626.
- 5- TIOLLAIS P., POURCELL C., DEJEAN A.: The Hepatitis B Virus. Review Article Nature 1985; 317:489-495.
- 6- TIOLLAIS P., BUENDIA M.: Hepatitis B Virus. Sci Am 1991; 264:116-123.
- 7- HOOFNAGLE J., PONZETTO A., MATHIESEN L., WAGGONER J., BUSKELL, BALES Z., SEEFF L.: Serological Diagnosis of Acute Viral Hepatitis. Digestive Diseases and Sciences 1985; 30:1022-1027.
- 8- KRYGER P.: Significance of Anti-HBc in the differential Diagnosis of Viral Hepatitis.(Review). J Virol Met 1985; 10:283-289.
- 9- SJOGREN M., HOOFNAGLE J.: Immunoglobulin M Antibody to Hepatitis B Core Antigen in patients with chronic type B Hepatitis. Gastroent 1985; 89:252-258.
- 10- BRUNETTO M., CERENZIA M., OLIVERI F., PIANTINO P., RANDOME A., CALVO P., MANZINI P., ROCCA G., GALLI C., BONINO F.: Monitoring the natural course and response to therapy

- of chronic Hepatitis B with an automated semi-quantitative assay for IgM anti-HBc. *J Hepatol* 1993; 19:431-436.
- 11- MARINOS G., SMITH H., NAOUMOV N., WILLIAMS R.: Quantitative assessment of serum IgM anti-HBc in the natural course and during interferon treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1994; 19:303-311.
- 12- PUJOL F., BERTOLOTTI A., FIELDS H., KHUDYAKOV Y., KALANINA T., LIPRANDI F.: A Monoclonal inhibition enzyme immunoassay for detection of antibodies against Hepatitis B core antigen: conformation of an immunodominant epitope. *J Immunoass* 1994; 15:239-249.
- 13- LAEMMLI U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- 14- TOWBIN H., STAEBELIN T., GORDON J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.
- 15- STAHL S., MACKAY P., MAGAZIN M., BRUCE S., MURRAY K.: Hepatitis B virus core antigen: Synthesis in *Escherichia coli* and application in diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:1606-1610.
- 16- STANDRING D.N.: The Molecular Biology of the Hepatitis B Virus Core Protein. En: McClachlam, A. (Ed.). *The Molecular Biology of the Hepatitis B Virus*. CRC Press, Inc., U.S.A. 1991. p.145-169.
- 17- EBLE K., CLEMENS J., KRENC C., RYNNING M., STOJAK J., STUCKMANN J., HUTTEN P., NELSON L., DUCHARME L., HOJVAT S., MIMMS L.: Differential Diagnosis of Acute Viral Hepatitis Using Rapid, Fully Automated Immunoassays. *J Med Virol* 1991; 33:139-150.
- 18- GERLICH W., UY A., LAMBRECHT F., THOMSEN R.: Cutoff Levels of Immunoglobulin M Antibody against Viral Core Antigen for Differentiation of Acute, Chronic and Past Hepatitis B Virus Infections. *J Clin Microbiol* 1986; 24:288-293.