

### Inmunoensayo potenciométrico de enzima ligada (IPELI) para la detección del subtipo "ad" del antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg)

A.J. OTERO, I. RODRÍGUEZ, B.L. RODRÍGUEZ y C. PASCUAL

Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC), Avenida 25 y 158, Apartado 6880, Cubanacán, La Habana, Cuba.

Recibido en octubre de 1988

Aprobado en enero de 1989

La búsqueda de métodos cada vez más sensibles, rápidos y capaces de ser automatizados, constituye una tendencia creciente en el campo del análisis cuantitativo o semicuantitativo, y en especial en el diagnóstico biológico (Avrameas, 1978).

Los inmunoensayos no isotópicos de tercera generación continúan en la tendencia de encontrar nuevos sistemas de amplificación de la actividad enzimática, ya sea por el uso de ciclos de reacción manteniendo el principio colorimétrico de detección o cambiando radicalmente el concepto de evaluación de la actividad de las enzimas involucradas en el ensayo. En este último caso se encuentran los métodos fluorimétricos, luminométricos, amperométricos y potenciométricos.

La potencimetría en general como método de análisis en el laboratorio clínico, tiene la ventaja de ser independiente de la turbidez de la muestra, pudiendo utilizarse muy pequeña cantidad de reactivos. Esto hace que cada vez se le dedique más atención y se busquen insistentemente sistemas REDOX que cumplan los requerimientos para una determinación analítica (Borrajero y Pascual).

En este trabajo se ha explorado el cromógeno ABTS® (di-amonio 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato) cuya fórmula molecular es  $C_{18}H_{16}N_4O_6S_4(NH_4)_2$  para revelar potenciométricamente un inmunoensayo directo que detecta al subtipo "ad" del HBsAg, que responde a la ecuación general de Nernst:

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{aG^a aH^b}{aA^a aB^b} \text{ a } 25^{\circ} \text{ C}$$

y que está basado en las siguientes medias ecuaciones de oxidación-reducción:



Con una resultante:



El inmunoensayo diseñado a tales efectos constó, sumariamente, de los siguientes pasos:

Placa de cloruro de polivinilo (PVC)

- 1) 100  $\mu$ l de anticuerpo monoclonal CN-A<sub>1</sub> (Otero, A., 1987) que reconoce al HBsAg "ad". Una hora a 37°C.
- 2) 150  $\mu$ l de suero de carnero al 10 % en tampón fosfato conteniendo Tween 20 al 0,05 % (PBS-T20). 15 min a 37°C.
- 3) 100  $\mu$ l de muestras de suero a ensayar además de controles de PBS-T20, suero humano normal y suero humano positivo al HBsAg "ad". Una hora a 37°C.
- 4) 100  $\mu$ l de conjugado CN-A<sub>1</sub> peroxidasa 1:200 en PBS-T20 conteniendo suero fetal bovino al 4 %. Una hora a 37°C.
- 5) Sustratos:
  - A. 150  $\mu$ l de ABTS 0,2 mM/l; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,004 %, citrato de sodio 100 mM/l, fosfato de sodio dibásico 100 mM/l y perborato de sodio 1,5 mM/l, pH 5 (lectura potenciométrica según se describe más adelante).
  - B. 150  $\mu$ l de ortofenilendiamina (OPD) 40 mg/100 ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,04 %, tampón fosfato-citrato de sodio 200-100 mM/l, pH 5 (lectura colorimétrica en lector de microplacas MULTISKAN MCC).

En ambos casos, el contenido de los pocillos fue transferido a placas no reactivas para detener así la reacción enzimática.

Para la lectura potenciométrica, el elemento sensor consistió en un electrodo de platino RADIOMETER 1312 PT de sección plana de 1/2 cm<sup>2</sup> colocado horizontalmente, sobre el que se depositó un volumen de lectura de cada muestra de 20  $\mu$ l. Perpendicularmente y haciendo contacto con la gota se instaló un electrodo de referencia de calomel. Las lecturas se efectuaron en un pHmetro RADIOMETER tipo PMH 28 (Borrajero y Pascual).

La figura 1 muestra los resultados del ensayo potenciométrico en delta ( $\Delta$ ) milivoltios con respecto a las muestras de suero HBsAg "ad" positivo diluido y controles.

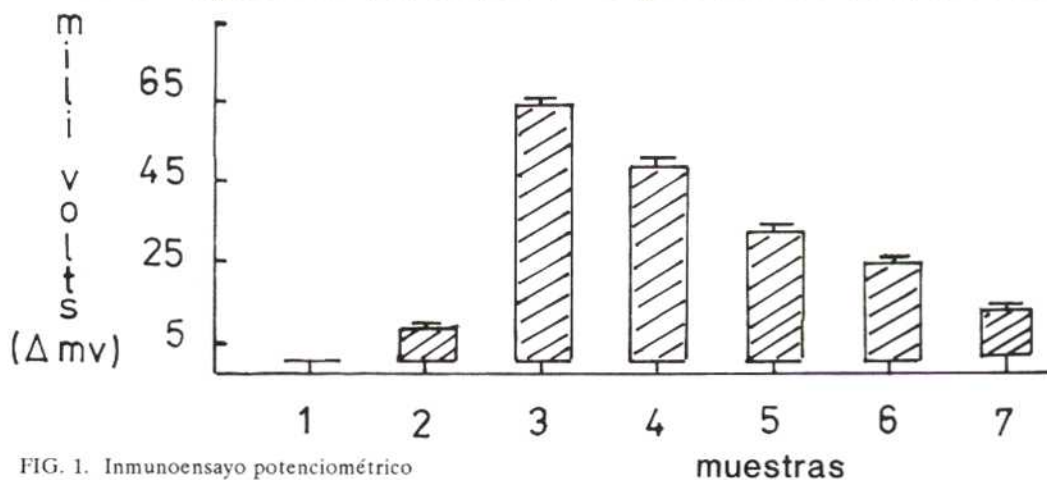


FIG. 1. Inmunoensayo potenciométrico

1. PBS-T20

2. Suero humano normal

3. Suero humano HBsAg + "ad" 1:1

4. Suero humano HBsAg + "ad" 1:20

5. Suero humano HBsAg + "ad" 1:50

6. Suero humano HBsAg + "ad" 1:100

7. Suero humano HBsAg + "ad" 1:200

El potencial electroquímico para la solución de sustrato ABTS en un pocillo virgen no reactivo fue de alrededor de 315 mV (durante la primera media hora) con respecto al electrodo de calomel lo que permite considerarlo como potencial  $E_0$  de referencia para este sistema. A partir de este tiempo, la influencia de la reducción del  $H_2O_2$  por causas diferentes a la acción de la peroxidasa fue significativa.

El fondo del ensayo eliminado con la consideración  $E_0 = 315$  mV representa un potencial electroquímico de base con respecto a la solución de sustrato en equilibrio con una proporción del producto de la reacción enzimática que definiría el verdadero fondo inmunoquímico del ensayo. La lectura para la dilución 1:200 del suero HBsAg "ad" + es diferenciable del valor obtenido para el suero humano normal (control negativo) tomando como criterio 2DS (desviación típica). La razón positivo/negativo resultó 1:5 para esta misma muestra y el múltiplo de la actividad normal (MONA) (Voller, A. y Bidweel, D., 1980) concebido como  $[\Delta mv (\text{muestra})]/[\Delta mv (\text{muestra negativa})]^n$  (donde  $n$  representa el exponente parabólico de la curva dosis-respuesta de la muestra positiva), no fue mayor de 3,0. El coeficiente de variación (C.V.) para cuatro réplicas utilizadas fue 2,1 %.

La figura 2 muestra un ensayo en las mismas condiciones revelado con OPD en el que la lectura para la dilución 1:200 del suero HBsAg "ad" es dos veces mayor (razón = 2) que para el control negativo y el valor de MONA para esa misma muestra fue de 3,9. El C.V. para el mismo número de repeticiones fue de 4,1 %.

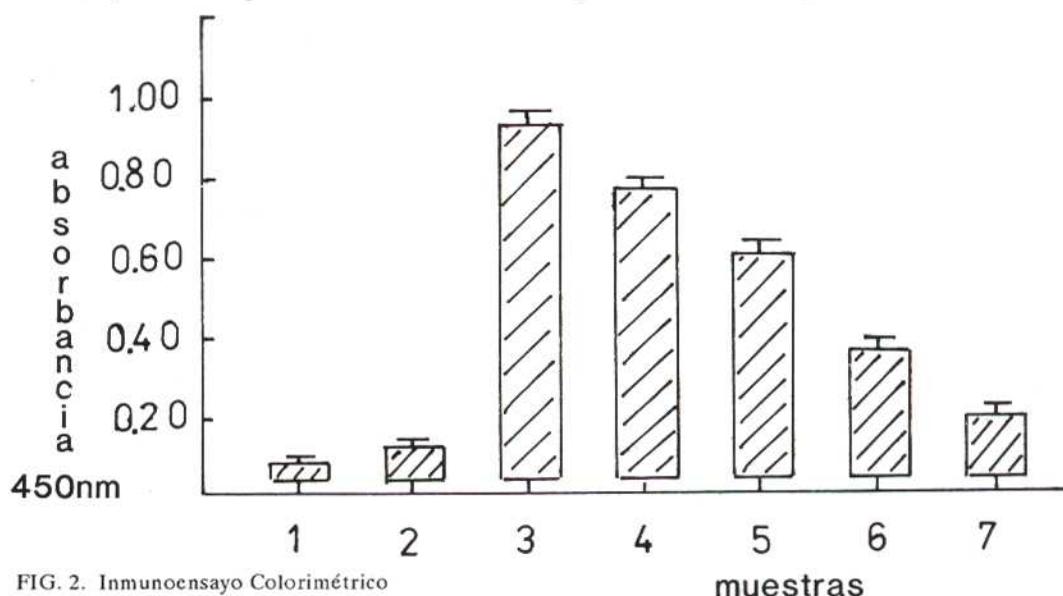


FIG. 2. Inmunoensayo Colorimétrico

1. PBS-T20
2. Suero humano normal
3. Suero humano HBsAg + "ad" 1:1
4. Suero humano HBsAg + "ad" 1:20
5. Suero humano HBsAg + "ad" 1:50
6. Suero humano HBsAg + "ad" 1:100
7. Suero humano HBsAg + "ad" 1:200

En otro experimento utilizando una placa de PVC tipo SUMA (Fernández Yero, *et al*, 1985) de 10  $\mu$ l de volumen de reacción se obtuvieron resultados

similares en cuanto a sensibilidad del ensayo potenciométrico con un C.V. de 3,8 %. En este caso no pudo realizarse la comparación por la vía colorimétrica por no contarse con la sensibilidad necesaria para 10  $\mu$ l.

Estos resultados indican que el ensayo potenciométrico IPELI basado en el sistema de revelado peroxidasa-ABTS pudiera representar una alternativa para los inmunoensayos de tipo enzimático sobre todo cuando se disponga de una base tecnológica de medición automática más adecuada para evaluar ensayos con ultramicro volúmenes que representan una ventaja importante con respecto a los colorimétricos con volúmenes nunca menores de 100  $\mu$ l.

#### REFERENCIA

- AVRAMEAS, S. (1978). *Quantitative enzyme immunoassay*. Scand. J. Immunol. **8**: 7-23.
- BORRAJERO, M. y C. PASCUAL. *Potentiometric determination of glucose in blood samples*. Enviada a The Analyst.
- FERNANDEZ YERO, J.L.; A. ECHEVARRIA y A. CADIZ (1985). *UltramicroELISA para la titulación de anticuerpo antitoxina tetánica*. Libro de resúmenes, IX Seminario Científico CENIC, La Habana, p. 402.
- OTERO, A. (1987). Tesis de candidatura. CENIC, La Habana.
- VOLLER, A. y D. BIDWEEL (1980). *The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Vol I. Micro Systems LTD. Sumerfield House. Vale, Guernsey, pp. 32-33, Inglaterra.