

EL EMPLEO DE LECHE DE SOYA COMO BLOQUEADOR PARA PRUEBAS INMUNO-ENZIMATICAS EN DISCOS DE NITROCELULOSA. ^a

Norma Sierra Romero ^b

RESUMEN

En México, es necesario el uso de técnicas de diagnóstico que sean confiables, certeras y de bajo costo. Dentro de las tendencias del proceso de adaptación tecnológica, se pretende evitar la dependencia de reactivos de importación, por lo que es imprescindible la búsqueda de sustancias alternativas y de óptimo funcionamiento. Los métodos inmunoenzimáticos son ampliamente usados en los laboratorios por ser altamente sensibles y específicos, sin embargo, por ello mismo es necesario cuidar cada parámetro involucrado en su procedimiento como la sustancia amortiguadora (buffer) utilizado, pH, temperatura y períodos de incubación, sustrato empleado, etc. Se ha estado tratando de estandarizar la técnica de DOT-ELISA para detectar anticuerpos antirrábicos en perros y uno de los pasos más importantes para la eliminación de resultados falso-positivos es el bloqueo de los elementos inespecíficos que puedan interferir con la prueba. Se encontró que la Leche de Soya es un excelente bloqueador que actúa de igual manera que la albúmina sérica bovina. Por primera vez, se reporta su uso en un método enzima-inmunoensayo, siendo ésta de bajo costo y fácil acceso a todos los países en vías de desarrollo tecnológico.

Téc. Pec. Méx. Vol. 29 No. 3 (1991)

Una de las preocupaciones dentro del campo de la investigación en México es el manejo de técnicas de diagnóstico de enfermedades que presentan los animales las cuales sean certeras, sensibles, rápidas y de bajo costo. Para llegar a este objetivo, es necesaria la estandarización de las técnicas ya establecidas en los países desarrollados las cuales puedan ser aplicables en nuestro país, asimismo, accesibles a aquellos que necesitan saber el diagnóstico preciso de algún tipo de infección que afecte a una determinada especie animal. Una de las tendencias dentro de este proceso de adaptación tecnológica es el evitar, hasta donde sea posible, la dependencia de reactivos de importación; por ello, se tienen que hacer pruebas bioquímicas para dar alternativas de uso de sustancias que sean útiles dentro de los diferentes métodos diagnósticos.

Las técnicas inmuno-enzimáticas nos

permiten diferenciar e identificar a los agentes patógenos ¹⁷ directamente de las muestras que se tomen. Son métodos considerados como de alta sensibilidad dentro de los cuales existe un buen número de variantes ⁷ dado que identifican determinantes antigénicos propios del agente infeccioso dentro de la especie animal que se requiera. Por esto mismo, a fin de que el sistema inmunoensayo empleado tenga éxito, es necesario cuidar cada uno de los pasos que se sigan pues las variantes que se manejan como pH, temperatura, tiempos de incubación, etc. pueden variar el resultado final. Aunado a esto, la muestra empleada debe estar libre de contaminantes, ya que la alta especificidad de la prueba lo exige para evitar interferencias con otros materiales que pudieran estar presentes en los líquidos orgánicos del animal enfermo.

Las pruebas conocidas como "ELISA", rápidamente se han convertido en uno de los procedimientos de laboratorios clínicos y bioquímicos más utilizados para la identificación de anticuerpos, antígenos o haptenos ^{3,4,10,15}. La técnica de "DOT-ELISA", es

a Recibido para su publicación el 5 de julio de 1991.
b CENID-MICROBIOLOGIA-INIFAP-SARH. Km 15.5
Carr. México-Toluca. Palo Alto. C.P. 05110, México,
D.F.

una variante que nos permite hacer esta identificación sin la necesidad de que se tenga un aparato lector de placas de "ELISA" observando los resultados a simple vista y en forma colorimétrica^{1,9,10,12,16}. El principio de la prueba es el mismo que en otros inmunoensayos y la modificación consiste en colocar el antígeno sobre un disco de nitrocelulosa en forma de punto⁸, se agregan las diluciones de los sueros problema, posteriormente se le añade el conjugado y si la muestra presenta anticuerpos contra ese antígeno, reacciona. Lo que no se unió, se elimina lavando y la enzima unida, se cuantifica al agregar el sustrato^{2,7,16,23}.

Se ha tratado de estandarizar la prueba de DOT-ELISA para el diagnóstico de Rabia, sin embargo, este proceso implica una intensa experimentación y el cuidado de cada uno de los pasos incluidos¹⁹. Dentro de este camino, se ha encontrado que las sustancias amortiguadoras (buffers) fosfatadas se deterioran rápidamente, lo que conduce a cambios iónicos y de pH significativos que pueden afectar la capacidad de unión de los reactivos cuando se usan membranas altamente sensibles al pH como es el caso de la de nitrocelulosa¹¹. Dado que los buffers Tris son más estables, se procedió a trabajar con una solución salina de trietanolamina (TBS)¹⁶. Para que se saturen los sitios libres de la membrana en donde no se encuentra pegado el antígeno, se agrega un bloqueador con el fin de evitar la inespecificidad de la prueba y por ende la alteración de los resultados finales^{11,21}. Esto condujo hacia la búsqueda de sustancias ideales para tener un diagnóstico adecuado con esta metodología.

El paso de la inmovilización del antígeno a la fase sólida es de primordial importancia: si la concentración de macromoléculas es muy grande, los inmuno-reactivos poco unidos se eliminan en las subsecuentes incubaciones y compiten con los fuertemente unidos por los reactivos que se van adicionando¹⁸. El equilibrio entre el área de superficie con respecto al volumen dentro de la matriz microporosa de la membrana, asegura distancias de corta difusión y, por lo

tanto, la rápida unión de los reactivos de fase líquida a fase sólida^{7,22}.

Las sustancias bloqueadoras utilizadas son de gran importancia pues su función es la de saturar los sitios libres sobre la fase sólida para evitar la adsorción inespecífica de los inmuno-reactantes y promover la re-naturalización de los sitios antigénicos¹¹. Estos elementos bloqueadores que se agregan en el proceso, van disueltos en una solución amortiguadora (buffer) a determinado pH. Una solución "buffer" es aquella que resiste un cambio en la concentración del ión H al agregar un ácido o un alcalino. Esta resistencia se conoce como "acción del buffer" y su magnitud se mide por la llamada "capacidad del buffer"²². Los criterios sobre los buffers adecuados para su uso en la investigación, se pueden resumir a lo siguiente²²: 1) deben tener la capacidad adecuada con el pH requerido; 2) deben tener un alto grado de pureza; 3) deben ser muy solubles en agua e impermeables a membranas biológicas; 4) ser enzimática e hidrolíticamente estables; 5) su pH debe ser mínimamente influenciado por su composición iónica, temperatura o efecto de sal en el medio; 6) no ser tóxico ni actuar como inhibidor enzimático; y 7) no deben absorber la luz en regiones visibles o ultravioleta.

El principio de esta parte experimental consistió en cortar discos de papel de nitrocelulosa (poro 0.22 μm , Millipore Inc., Bedford, USA) con un diámetro de 5 mm. Usando placas de microtitulación de fondo plano (96 pozos, NUNC Inc. Denmark), se colocó un disco por pozo para posteriormente fijar en cada uno la cantidad de 1 a 3 μl . del antígeno rábico V-319 Acatlán (polivalente) con un título de $10^{5.6}$. Se dejó secar durante 20 min. a una temperatura de 40 C, para comenzar el bloqueo de los sitios libres de la membrana y evitar así la penetración de elementos no deseados al adicionar los sueros problema y sustancias utilizadas en el proceso de la prueba. Se congelaron a -20 C hasta su uso las placas que no eran utilizadas en esos momentos, ya que en estas condiciones pueden permanecer almace-

nadas por varios meses sin que el antígeno fijado pierda su actividad⁸.

Se preparó como buffer TBS (Trietanolamine-buffered saline, SIGMA Chem., St. Louis, USA)¹⁷ pH 8.2, con el cual se llevaron a cabo todas las diluciones de la prueba.

Los bloqueadores más utilizados en las pruebas de ELISA y DOR-ELISA son: albúmina sérica bovina^{10,14,16}, suero de caballo²⁰, leche descremada (skim milk)¹ y en menor escala gelatinas y otros^{20,23}. En México, es muy fácil encontrar leche de soya, la cual tiene un contenido proteico similar a otra proteínas que derivan de un origen animal⁶. Por este motivo se procedió a correr la prueba de Lowry¹³ para la leche de soya y compararla con la albúmina sérica bovina. Las diluciones se hicieron utilizando solución salina pH 7.6. Los resultados se leyeron con la ayuda de un espectrofotómetro (Bausch and Lomb, USA) a una densidad de 700 nm., obteniendo así las curvas comparativas de mg/ml de ambas fuentes de proteínas (Gráfica 1) y observando un comportamiento similar, por lo que se procedió a su uso para la prueba de DOT-ELISA. Los resultados se compararon usando albúmina sérica bovina (GIBCO Co., N.Y., USA).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se procedió a trabajar con la dilución de 30 mg/ml de la leche de soya comercial diluida. Se descongelaron nueve placas con el antígeno fijo a un mismo título ($10^{5,6}$) y se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente (22 C). se diluyeron los 30 mg/ml de la leche de soya en el buffer de TBS pH 8.2 con 0.1% de Tween 20 (SIGMA CHEM., St. Louis, USA) detergente no-iónico que ayuda a facilitar el bloqueo²⁰. En otro matraz, se diluyeron 30 mg/ml de albúmina sérica bovina (ASB) en TBS pH 8.2 y 0.1% de Tween 20. La mitad de cada placa se trabajó utilizando leche de soya diluida y la otra mitad se trabajó con albúmina sérica bovina (Cuadro 1). Se añadieron 100 μ l/pozo de cada dilución (columnas 1-6 Leche de soya diluida y columnas 7-12 albúmina sérica bovina) con el fin de proceder al bloqueo. Se incubaron las placas a 40 C variando el tiempo de incubación para cada una de las nueve placas siendo

éste de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 min. respectivamente.

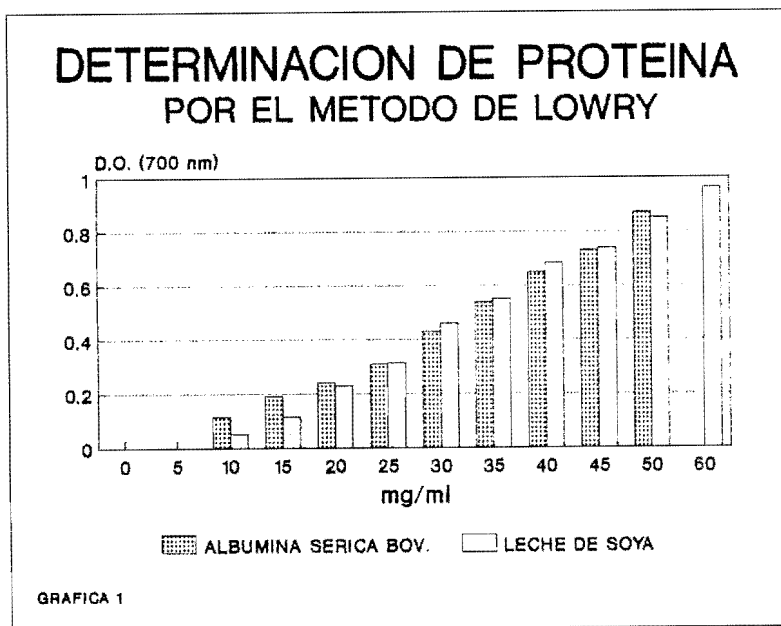
Se prosiguieron los demás pasos del procedimiento de la técnica de DOT-ELISA siendo idénticos para las nueve placas. Solamente varió con respecto al uso de la leche de soya o la albúmina sérica bovina con el fin de comparar su efectividad al finalizar el experimento.

Transcurrido el período de incubación del bloqueo, se vaciaron los pozos para proceder a añadir 100 μ l/pozo de los sueros problema en diluciones quintuplas (1:5, 1:25, 1:125 y 1:625) y por duplicado (Cuadro 1). Las diluciones de los sueros se hicieron usando una dilución de 2% de leche de soya en TBS con 0.1% de Tween 20 en la mitad de la placa y 2% de ASB en TBS con 0.1% de Tween 20. Se incluyó un pozo para control del buffer y las diluciones correspondientes a los sueros de control positivo y negativo (Cuadro 1). La incubación fué de 30 min. a 40 C.

Una vez transcurrido este período, se lavaron los pozos dos veces con 2% de leche de soya en TBS pH 8.2 y 0.1% de Tween 20 la mitad de la placa correspondiente y la otra con 2% de ASB en TBS pH 8.2 y 0.1% de Tween 20. Después de lavar, se procedió a diluir el conjugado IgG conejo anti-perro acoplado con peroxidasa (SIGMA CHEM. St. Louis, USA) 1:500. Se diluyó con la misma solución de lavado (parte con leche de soya y parte con ASB). Se añadieron 50 μ l/pozo y se incubaron las placas por 30 min. a 40 C.

Transcurrido el período de incubación, se lavaron las placas dos veces de la misma manera como se hizo la vez anterior para posteriormente agregar el sustrato. Se usó en este caso 3,3' Diaminobenzidina (SIGMA CHEM. St. Louis, USA) diluida en TBS únicamente agregándole 10 μ l de H₂O₂. Se añadieron 100 μ l/pozo dejando incubar las placas por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron los pozos dos veces con agua destilada para detener la reacción y se procedió a leer los resultados de cada placa a simple vista.

El punto del disco en que se colocó el



CUADRO 1. TITULOS DE ANTICUERPOS ANTIVIRUS DE RABIA EN SUEROS DE PERRO, DETERMINADOS POR MEDIO DE LA PRUEBA DE DOT-ELISA UTILIZANDO COMO BLOQUEADORES LECHE DE SOYA (LS) Y ALBUMINA SERICA BOVINA (ASB) ^{a)}.

SUEROS ^{b)}	BLOQUEADOR	TITULO ^{c)}	
		Mínimo	Máximo
CONTROL NEGATIVO	LS	-	-
	ASB	-	-/+
CONTROL POSITIVO	LS	1:5	> 1:625
	ASB	1:5	> 1:625
1	LS	1:5	1:625
	ASB	1:5	1:625
2	LS	1:5	1:125
	ASB	1:5	1:125
3	LS	1:5	> 1:625
	ASB	1:5	1:625
4	LS	1:5	1:625
	ASB	1:5	1:625
5	LS	1:5	1:25
	ASB	1:5	1:25

a) Los discos de nitrocelulosa fueron sensibilizados de 1-3 μ l de antígeno rábico cepa V-319 Acatlán con un título de $10^{5.6}$. Se usó la 3,3' Diaminobenzidina.

b) Sueros de perro positivos a anticuerpos contra virus de rabia determinados previamente por la prueba de Seroneutralización en ratón.

c) Los sueros se corrieron por duplicado.

antígeno rábico, mostró una coloración café la cual iba disminuyendo de intensidad proporcionalmente con respecto a la dilución en el caso de los sueros de perros vacunados y con presencia de anticuerpos contra el virus de la rabia. En el caso de sueros negativos (sin anticuerpos presentes), no se observó coloración alguna.

El procedimiento de bloqueo de cada una de las nueve placas utilizadas, varió con respecto al tiempo de incubación pero manteniendo constantes las demás variables como pH, temperatura, constante antigénica y sustancia bloqueadora (para cada mitad de la placa). El objetivo de esta parte de la prueba, fué la de eliminar la tinción inespecífica alrededor del punto donde se localiza el antígeno en la membrana de nitrocelulosa.

Las placas que se dejaron incubando menos de 30 min., mostraron este efecto inespecífico, indicando así que no hubo suficiente tiempo para un bloqueo de los puntos libres de la membrana en que no había antígeno pegado, permitiéndole así el acceso a otras moléculas de los reactivos utilizados que se alinean para reaccionar enmascarando la unión antígeno-anticuerpo alterando el resultado. En el caso de las placas que se incubaron de 30 min. en adelante para este paso en particular, se vió con claridad la eliminación de reacciones inespecíficas. En el caso del bloqueo con albúmina sérica bovina, la tinción inespecífica alrededor del antígeno en la membrana, no se eliminó por completo en ninguna placa; disminuyó considerablemente en las placas incubadas por 40 y 45 min. Con esto, se puede decir que el uso de la leche de soya como bloqueador fué más efectivo. Con solo 30 min. de incubación, se pueden bloquear los puntos libres del disco alrededor del antígeno rábico para evitar los resultados falso-positivos y falso-negativos. Este punto es de vital importancia para que una prueba tenga validez, siendo lo más precisa y confiable hasta donde sea posible.

Los métodos inmunoenzimáticos se caracterizan por su alta especificidad y sensibilidad^{1,3,5,14,15,20}, pero existen varios fac-

tores responsables de que se den reacciones poco sensibles o inespecíficas. La preparación del antígeno a partir de animales o cultivo celular a menudo contiene determinantes antigénicos originados del hospedero y que persisten a pesar de la purificación del mismo, ésto puede dar como resultado final reacciones de tipo falso-positivas²³.

Este problema se presenta en nuestra prueba de DOT-ELISA, por lo que se obtendrá otra fuente antigénica preparada a base de Ingeniería Genética con el fin de asegurar la confiabilidad de la prueba.

Es sabido que los anticuerpos de un antisuero policlonal, tienen diferentes afinidades para cada determinante antigénico¹⁰ y su importancia en estos inmunoensayos es obvia porque el virus se mide solo después de su asociación con el anticuerpo y la afinidad determinará la fracción de unión antigénica, así como de concentraciones de antígeno y anticuerpo de acuerdo a la ley de acción de masas²⁰. Se puede demostrar que los anticuerpos de baja afinidad, se unirán pobremente al virus y que los múltiples pasos de lavado pueden dar como resultado la falta de unión antigénica. Quizás este es un punto importante por el cual no tenemos un 100% de confiabilidad en nuestro DOT-ELISA.

El bloqueo de elementos inespecíficos, ayuda a tener resultados certeros pues la adsorción inespecífica de proteínas puede causar una baja en la actividad enzimática; ésto puede deberse a enzimas contaminantes, inmunoglobulinas o conjugado¹¹. La sensibilidad de la prueba decrecería considerablemente. Por estas razones, es de primordial importancia el haber comprobado experimentalmente la utilidad de la leche de soya como bloqueador de sustancias que pueden alterar los resultados finales de una prueba tan sensible como es DOT-ELISA. Su comparación con respecto a la albúmina sérica bovina nos comprueba una similitud bioquímica⁶. Su facilidad de obtención y bajo costo significa la posibilidad de tener un bloqueador accesible a países como el nuestro en vías de desarrollo tecnológico y así poder estandarizar técnicas de diagnóstico con recursos propios del país.

SUMMARY

In Mexico, it is necessary the use of reliable, accurate and inexpensive diagnostic techniques. Within the tendencies through the technological adaptation process, it is pretended to avoid imported reagent dependency, this is why its indispensable to pursuit for alternative substances and of optimum performance. The enzyme immunoassays are widely used at the laboratories because of their high sensibility and specificity; nevertheless, for this same reason, it is necessary to care for each parameter involved during its procedure as buffer to use, pH, temperature and incubation period, substrate employed, etc. It has been tried to standarize the DOT-ELISA assay to detect anti-rabies antibodies in dogs and one of the most important steps to eliminate false-positive results is blocking the nonspecific elements that can interfere with the test. It was found that the soybean milk is an excellent blocking agent that behaves the same as bovine seric albumin. For the first time, was report its use at an enzyme immunoassay method, being of a low price and of easy approach to all those countries in way to the technological development.

LITERATURA CITADA

1. AFSHAR, A. and MYERS, D.J., 1986. Simple and rapid dotenzyme immunoassay for visual detection of rinderpest antibodies in bovine and caprine sera. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 18:209.
2. ATANASIU, P., PERRIN, P. and DELAGNEAU, J.F., 1980. Use of an enzyme immunoassay with protein A for rabies antigen and antibody determination. *Develop. Biol. Stand.* 46:207.
3. CZERKINSKY, C.C., TARKOWSKI, A., NILSSON, L.A., OUCHTERLONY, O., NYGREN, H. and GRETZER, C., 1984. Reverse enzyme-linked immunospot assay (RELISPOT) for the detection of cells secreting immunoreactive substances. *J. Immunol. Meths.* 72:489.
4. DEMMLER, G.J., STEINBERG, S.P., BLUM, G. and GERSHON, A.A., 1987. Rapid enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibody to varicella-zoster virus. *J. Infect. Dis.* 157 (1):211.
5. DINTER, Z., 1989. Diagnostic virology: A review of methods at the National Veterinary Institute. *FAO. IAEA. SIDA*, Uppsala, Sweden 1-125.
6. DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. and SCATEN, L., 1965. Nutritional value of protein from a soybena milk powder. *J. Food Sci.* 32:592.
7. FLORES, J., PURCELL, R.H., PEREZ, I., WYATT, R.G., BOEGGEMAN, E., SERENO, M., WHITE, L.,

CHANOCK, R.M. and KAPIKIAN, A.Z., 1983. A dot hybridisation assay for detection of rotavirus. *Lancet* 12: 555.

8. HAWKES, R., NIDAY, E. and GORDON, J., 1982. A dot immunobindig assay for monoclonal and other antibodies. *An Biochem.* 119:142.

9. KAFATOS, F.C., JONES, C.W. and EFSTRATIADIS, A., 1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nuc. Ac. Res.* 7(6):1541.

10. KRECH, U. and WILHELM, J.A., 1979. A solid-phase immunosorbent technique for the rapid detection of rubella IgM by haemagglutination inhibition. *J. Gen. Virol.* 44: 281.

11. KURSTAK, E., TIJSSSEN, P. and KURSTACK, C., 1984. Enzyme immunoassays applied in virology: reagents preparation and interpretation. *Academic Press Inc.* Florida, U.S.A., 418.

12. LEARY, J.J., BRIGATI, D.J. and WARD, D.C., 1983. Rapid and sensitive colormetric method for visualizing biotinlabeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilizad on nitrocellulose: Bio-Blots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 4045.

13. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.

14. LIN, T.M. and HALBERT, S.P., 1986. Rapid dot enzyme immunoassay for the detection of antibodies to cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* 24(1):7.

15. MELENDEZ, L.V., SCHRIG, G.G., SCHUDEL, A.A., DEVERY, J.E. and DELLERS, L.M., 1987. Manual de diagnóstico rápido de enfermedades virales de los animales utilizando métodos inmunoenzimáticos. *II-CA: Serie de Salud Animal No. 15.* 1.

16. PAPPAS, M.G., HAJKOWSKI, R. and HOCKMEYER, W.T., 1983. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (DOT-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Meths.* 64:205.

17. SAMTER, M. et. al., 1971. Immunological Diseases. Vol. I, Second Ed. *Little Brown and Co.*, Boston, USA, 1-764.

18. SEDWICK, J.D. and HOLT, P.G., 1983. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Meths.* 57:301.

19. SIERRA, R.N., CUEVAS, R.S., HERNANDEZ, B.E. y

BATALLA, C.D., 1991. El uso de métodos inmunoenzimáticos para la detección de anticuerpos antirrábicos en perros. *Mem. XXII Congr. Nal. AMMVEPE* 41.

20. TOWBIN, H. and GORDON, J., 1984. Immunoblotting and dotimmunobinding current status and outlook. *J. Immunol. Meths.* 73:313.

21. VALKIRS, G.E. and BARTON, R., 1985. Immunoconcentration: A new format for solid-phase immu-

noassays. *Clin. Chem.* 31(9): 1427.

22. WILLIAMS, B.L. and WILSON, K., 1974. A biologist's guide to: Principles techniques of practical biochemistry. *Ed. Arnold, USA*, 1-256.

23. YOLKEN, R.H., 1982. Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids: Current limitations and future prospects. *J. Infect. Dis.* 4(1):35.