

# Ensayo de neutralización *in vitro* de aplicación en la evaluación de inmunógenos contra la hepatitis A, obtenidos mediante la tecnología de expresión en fagos filamentosos

Alicia Aguilar<sup>1\*</sup>, Raiza Martínez<sup>1</sup>, Frank Camacho<sup>1</sup>, Nevis Amin<sup>1</sup>, José Luis Alfonso<sup>1</sup>, David Stott<sup>2</sup>, Ela María Pérez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave 27, No 19805, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> University of Glasgow, 120 University Place, Glasgow G12 8TA, Scotland, U.K.

**email:** aaguilar@finlay.edu.cu

---

La inmunidad contra el virus de la hepatitis A (VHA) se debe en primera instancia a la inducción de anticuerpos neutralizantes. Disponer de ensayos de neutralización es indispensable para evaluar nuevos candidatos vacunales contra este patógeno. En el presente trabajo se desarrolló un ensayo de neutralización *in vitro* que permitió evaluar la inmunogenicidad de mimotopos del VHA obtenidos mediante la tecnología de expresión en fagos al ser inmunizados ratones Balb/c. Diferentes diluciones de anticuerpos se incubaron con  $10^3$  o  $10^2$  Dosis Infecciosas en Cultivo de Tejidos 50% (DICT<sub>50</sub>) del clon citopático HM175/18f de VHA, y se inocularon en placas con células FRhK4. Después de 7 días de incubación el título neutralizante se determinó como el recíproco de la dilución del suero capaz de reducir la multiplicación viral al 50%. Tanto  $10^3$  como  $10^2$  DICT<sub>50</sub> fueron neutralizadas por el anticuerpo monoclonal 7E7 y los sueros humanos (A12 y A31) positivos a anticuerpos anti-VHA. Los controles negativos del ensayo no neutralizaron al virus. Los títulos neutralizantes de los sueros de ratones inmunizados con fagos portadores de mimotopos de VHA oscilaron entre 4 y 16, mientras que los sueros preinmunes y los de ratones inmunizados con fago salvaje M13 no neutralizaron la infectividad viral. Este ensayo de neutralización resultó adecuado para la evaluación de los inmunógenos propuestos.

**Palabras clave:** VHA, neutralización, mimotopos, inmunogenicidad, fagos.

---

## Introducción

La hepatitis A es una enfermedad aguda que tiene una considerable morbilidad e impacto económico, especialmente en los países en desarrollo. El agente etiológico es el virus de la hepatitis A (VHA), perteneciente al género *Hepatovirus* familia *Picornaviridae* (1).

El desarrollo de vacunas inactivadas y atenuadas constituye un paso importante para el control de la hepatitis A (2). El lento ciclo de replicación y bajos títulos del VHA en cultivo de células conduce a que los costos de las mismas sean elevados, lo que limita su aplicación en los países en desarrollo, razón por la cual se ha valorado la posibilidad de desarrollar vacunas más económicas (3).

Se ha demostrado que los péptidos seleccionados a partir de bibliotecas expuestas en fagos, empleando anticuerpos producidos contra antígenos de diferentes patógenos, pueden ser de utilidad para el diagnóstico y la prevención de enfermedades (4). La identificación de mimotopos del VHA empleando esta metodología pudiera constituir una fuente alternativa de antígenos para desarrollar nuevos candidatos vacunales. La inmunidad contra el VHA se debe, en primera instancia, a la inducción de anticuerpos neutralizantes, por lo que es indispensable disponer de ensayos de neutralización para evaluar los nuevos candidatos en estudio (5).

Las cepas del VHA usualmente provocan poco o ningún efecto citopático (ECP) en cultivos celulares. Para evidenciar su multiplicación se requiere de ensayos inmunológicos para la detección de antígeno viral u otras técnicas para localizar secuencias de ácidos nucleicos virus específicas (6). Varios ensayos de neutralización se han desarrollado teniendo en cuenta la naturaleza no citopática de la mayoría de las cepas del VHA (5, 7-10).

El ensayo de inhibición de radioinmunoensayos RIFIT (5) se recomienda para detectar anticuerpos neutralizantes contra el virus, pero es muy laborioso, consume mucho tiempo y requiere del uso de radioisótopos (11). Con el aislamiento de cepas citopáticas (12) pudieron desarrollarse ensayos basados en la aparición de ECP para la titulación viral y evaluación de presencia de anticuerpos neutralizantes (11). Estos son simples, emplean las técnicas tradicionales de cultivo de tejidos, no necesitan un sistema de detección complejo y pueden ser útiles para el control de vacunas y validación de protocolos de inactivación (11).

Teniendo en cuenta que en nuestro laboratorio contamos con el clon HM175/18f del VHA que produce ECP en corto tiempo en cultivo de células (12), nos propusimos desarrollar un ensayo de neutralización *in vitro* basado en la inhibición de la aparición de ECP, aplicable a la evaluación de

---

\* Lic. Microbiología, MC. en Microbiología, Investigador agregado. J' Grupo de Virología Molecular de la Vicepresidencia de Investigaciones del Instituto Finlay.

inmunógenos y candidatos vacunales contra el VHA desarrollados en nuestro laboratorio mediante la tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos.

## Materiales y métodos

### Cultivos celulares

Células de la línea FRhK-4 (ATCC CRL 1688, Estados Unidos) se propagaron en medio Dulbecco MEM (DMEM) (Gibco, Estados Unidos) con 10% de suero bovino fetal (SBF) v/v (Gibco, Estados Unidos) a 37 °C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### Preparación de un lote viral

El clon citopático HM175/18f del VHA (ATCC VR-1402, Estados Unidos) fue multiplicado en tres frascos de 75 cm<sup>2</sup> de células FRhK-4 a una multiplicidad de infección (m.o.i) de 0,1. Los frascos se incubaron a 37 °C y se observaron diariamente al microscopio óptico para detectar el efecto citopático.

Al séptimo día se procedió a realizar la cosecha viral. Posteriormente fue determinado el título viral en placas de 96 pozos (Nunc, Fisher Scientific, Reino Unido) con monocapas confluentes de células FRhK-4. Se inocularon 8 pozos con 50 µL de diluciones en base 10 del VHA en medio DMEM (GIBCO, Estados Unidos). Después de 1 h de adsorción viral a 37 °C se adicionaron 150 µL de DMEM/2% SBF v/v y las placas fueron incubadas durante 7 días a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. El título viral se calculó por el método de Reed y Muench (13).

### Inmunización de ratones

Los fagos (BA1-54, BA1-56, BA1-53, BA1-46 y el fago salvaje M13) fueron preparados para la inmunización, según describieron de la Cruz y colaboradores (14). Los clones de fagos fueron resuspendidos en Amortiguador Fosfato Salino (AFS), 0,15 M, pH 7,2, a concentraciones de 10<sup>12</sup> UFC/mL e inyectados intraperitonealmente en ratones BALB/c (cinco por grupo), a razón de 0,1 mL/ratón con una emulsión 1:1 con adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y con adyuvante incompleto para las reinmunizaciones a los 14 y 28 días. Los animales se desangraron a los 42 días y el suero fue colectado y guardado a -20 °C hasta su evaluación.

### Ensayo de neutralización

Se desarrolló un ensayo de neutralización *in vitro* similar al reportado por Beales y colaboradores (11). Para ello, 50 µL de diluciones seriadas de los sueros a evaluar se mezclaron con igual volumen de diluciones fijas del VHA; 10<sup>3</sup> y 10<sup>2</sup> Dosis Infecciosas en Cultivo de Tejidos 50% (DICT<sub>50</sub>), y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Posteriormente cada mezcla se inoculó en cinco pozos de placas de 96, sembradas con células

FRhK-4, y se incubó durante 1 h a 37 °C. Pasado este tiempo las monocapas celulares se lavaron tres veces con AFS y se adicionó DMEM que contenía el 2% SBF v/v como medio de mantenimiento. Las placas fueron incubadas por 7 días a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y observadas diariamente al microscopio óptico para determinar aparición de ECP.

En cada placa de 96 pocillos (Nunc, Reino Unido) se mantuvieron cinco como controles de células, a los cuales sólo se les adicionó medio de mantenimiento. Se inocularon, además, cinco pocillos con cada una de las diluciones de suero para evaluar su posible efecto tóxico para las células y con mezclas v/v de medio DMEM con 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup> y 0 DICT<sub>50</sub> del VHA, como controles de titulación retroversa del virus.

En un primer experimento se evaluaron las muestras siguientes:

- Anticuerpo monoclonal neutralizante anti-VHA 7E7 Mediagnost (45,3 UI/mL) a las diluciones 1/20 (2,260 UI/mL) y 1/40 (1,130 UI/mL).
- Sueros humanos A12 (314 UI/mL) y A31 (214 UI/mL) positivos a anticuerpos anti-VHA y el suero humano negativo 1936 (<0,015 UI/mL), negativo. Dichos sueros provienen de una seroteca conservada a -20 °C (colectados previo consentimiento informado de los donantes y titulados mediante el ELISA cuantitativo ELFA, VIDAS Anti-VHA Total, BioMérieux SA, Francia).
- Suero y Líquido Ascítico, ambos de ratón, negativos a la presencia de anticuerpos anti-VHA. Estas últimas muestras se evaluaron hasta la dilución 1/256.

Este experimento fue realizado dos veces y las placas fueron leídas por dos investigadores.

En un segundo experimento el ensayo se aplicó para evaluar los sueros de ratones inmunizados con fagos portadores de mimotopos del VHA, así como los sueros de los animales inmunizados con el fago salvaje M13 y los sueros preinmunes. El control positivo empleado fue el anticuerpo monoclonal 7E7 a la dilución 1/40 y como negativo, el suero de ratón dilución 1/100.

En este ensayo la inhibición de la multiplicación viral (ausencia de ECP) indica presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus. Para cada dilución se contabiliza el número de pocillos que presentan ECP sobre el total de pocillos inoculados y se calcula el porcentaje. La dilución de suero se considera positiva a la presencia de anticuerpos neutralizantes si hay una reducción de la multiplicación viral mayor o igual al 50% (11).

El título neutralizante del suero se determinó como el recíproco de la dilución de suero que redujo la multiplicación del virus al 50%, mediante el análisis Probit (15).

## Resultados y Discusión

Para la realización del ensayo partimos de un lote viral cuyo título fue  $1,12 \times 10^6$  DICT<sub>50</sub>/mL, el tiempo necesario para la aparición de ECP fue 7 días, lo cual está en el rango reportado para esta cepa (11).

Las dosis estándares  $10^3$  y  $10^2$  DICT<sub>50</sub> del VHA fueron suficientes para provocar ECP en los cinco pozos inoculados con controles virales. La presencia de anticuerpos específicos en las preparaciones de anticuerpos empleadas fue capaz de neutralizar la infectividad viral, lo que resultó en más del 50% de inhibición de la formación de ECP para las dos dosis de virus empleadas. El ajuste de la dosis estándar de virus es importante en la prueba de neutralización. En el presente ensayo tanto  $10^3$  como  $10^2$  DICT<sub>50</sub> del VHA resultaron útiles, pues en ambos casos los anticuerpos presentes en las muestras positivas fueron capaces de neutralizar al virus. Resultados similares se obtuvieron por Krah y colaboradores, al desarrollar un ensayo de neutralización cuya sensibilidad no se vio afectada a una concentración de virus entre  $10^3$  y  $10^{4.7}$  DICT<sub>50</sub>/mL (7). Zahn y colaboradores reportaron que no hubo variación en los títulos de anticuerpos neutralizantes ante dosis de virus de  $10^{3.4}$  y  $10^{5.4}$  DICT<sub>50</sub> (8). Dosis estándares de virus de 5000 DICT<sub>50</sub> (9) y de 500 DICT<sub>50</sub> (10) también se han empleado con resultados satisfactorios.

Las diluciones evaluadas del anticuerpo monoclonal 7E7 y del suero A12 redujeron la multiplicación viral en más del 50%, por lo cual todas se consideraron positivas a la presencia de anticuerpos neutralizantes. La última dilución en la que el suero A12 mostró este efecto fue 1/256 y se correspondió con 1,226 UI/mL. El suero A31 mostró un título promedio de  $2,67 \pm 0,18$ . El suero 1936, el de ratón y el Líquido Ascítico Negativos no neutralizaron la infectividad viral (0% de reducción de la multiplicación viral). No hubo variación persona/persona en la lectura de las placas por lo que los porcentajes de reducción de la multiplicación viral calculados por los dos investigadores fueron los mismos.

El comportamiento del anticuerpo monoclonal 7E7, de los sueros 1936 y de ratón y del Líquido Ascítico Negativo fue el esperado, dado el carácter neutralizante del primero y la ausencia de anticuerpos anti-VHA en los últimos. Cualquiera de las diluciones evaluadas de las muestras anteriores y del suero A12 pudieran ser empleados como controles en futuros ensayos. Sería de utilidad determinar los títulos neutralizantes del anticuerpo monoclonal y el suero A12 en futuros experimentos, lo que permitirá emplearlos más diluidos y consumir menos cantidad de ellos.

El suero A31, aunque presentó un alto título de anticuerpos anti-VHA, tuvo un título neutralizante bajo, por lo cual no recomendamos su uso. Las diluciones más bajas de suero no causaron efecto tóxico en las células, lo cual pudiera ser erróneamente interpretado como ECP.

Los sueros que se obtuvieron 42 días después de la inmunización de los ratones con los cuatro clones de fagos portadores de mimotopos del VHA neutralizaron la infectividad viral (Tabla 1). Los títulos neutralizantes de los mismos oscilaron entre 4 y 16 días. El anticuerpo monoclonal 7E7 (control positivo) produjo el mismo efecto a la dilución 1/40, que neutralizó al 66,6% la multiplicación viral. En contraste, el suero preinmune y el obtenido a partir de los animales inmunizados con el fago salvaje (M13) no neutralizaron al virus en ninguna de las diluciones evaluadas, así como la dilución 1/100 del suero de ratón (control negativo).

**Tabla 1. Títulos de anticuerpos neutralizantes anti-VHA en muestras de sueros tomadas antes de inmunizar y a los 42 días posinmunización.**

| Inmunógeno | Suero preinmune | Ratones evaluados posinmunización |    |    |    | Promedio $\pm$ DE* |
|------------|-----------------|-----------------------------------|----|----|----|--------------------|
|            |                 | 1                                 | 2  | 3  | 4  |                    |
| BA1-46     | -               | 16                                | 16 | 16 | 16 | 16 $\pm$ 0,0       |
| BA1-56     | -               | 8                                 | 8  | 4  | 16 | 8 $\pm$ 5,0        |
| BA1-53     | -               | 0                                 | 0  | 8  | 8  | 4 $\pm$ 4,6        |
| BA1-54     | -               | 4                                 | 8  | 4  | 8  | 6 $\pm$ 2,3        |
| M13        | -               | -                                 | -  | -  | -  | -                  |

Leyenda: Los resultados se expresan como el recíproco de la dilución de suero que reduce la multiplicación de la cepa HM175/f8 al 50%, se muestran los títulos para  $10^3$  DICT<sub>50</sub>.

\*Promedio y la desviación estándar de los títulos de los sueros posinmunización.

(-) ausencia de anticuerpos neutralizantes.

La presencia de anticuerpos neutralizantes en inmunógenos contra el VHA, que se desarrollaron en nuestro laboratorio mediante la tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos, fue posible evaluarla mediante la aplicación de este ensayo.

El hecho de que en la superficie de los fagos pueda ser expuesto un amplio repertorio de secuencias peptídicas al azar, ofrece la ventaja de poder seleccionar un gran número de secuencias en un tiempo relativamente corto. Para confirmar la utilidad de las secuencias seleccionadas como posibles candidatos vacunales es necesario evaluar la inmunogenicidad de las mismas fuera del ambiente del fago en forma de péptidos sintéticos. Los péptidos libres pueden adoptar múltiples conformaciones llevando a una baja concentración de las conformaciones necesarias para inducir la respuesta inmune específica contra el antígeno (16). De ahí que el empleo de la tecnología de expresión de péptidos en fagos filamentosos para seleccionar péptidos capaces de inducir una respuesta específica contra el VHA, impone evaluar la respuesta inmune inducida por múltiples candidatos. Un ensayo de neutralización simple y rápido, como el desarrollado por nosotros, resulta ventajoso para este propósito.

De los diferentes métodos empleados para evaluar la respuesta inmune humoral contra el VHA, sólo los ensayos

de neutralización identifican anticuerpos biológicamente relevantes y son los recomendados para medir anticuerpos contra el virus, particularmente aquellos generados después de la vacunación (7). El hecho de contar con un clon citopático del VHA de rápida multiplicación en cultivo celular nos permitió realizar el ensayo de neutralización basado en la inhibición de la aparición de ECP, como medida de la multiplicación viral, que resultó ser simple y no necesitó un sistema de detección complejo, sólo las técnicas tradicionales de cultivo de tejidos, lo cual resulta ventajoso para la evaluación de los múltiples inmunógenos y candidatos vacunales que permite obtener la tecnología de expresión en fagos. Con su aplicación evitamos desventajas propias de otros ensayos de neutralización.

## Referencias

- Cuthbert JA. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:38-58.
- Wasley A, Fiore A, Bell BP. Hepatitis A in the Era of Vaccination. *Epidemiologic reviews* 2006; 28:101-11.
- Muñoz M, Sospedra P, Gómara MJ, Mestres C, Haro I. The covalent coupling of HAV-VP3(110-121) synthetic peptide to liposomes: physicochemical studies. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 269:177-84.
- Wang LF, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. *Curr Drug Targets* 2004;5:1-15.
- Lemon SM, Binn LN. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 1983; 148:1033-9.
- Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A virus. En: Knipe DM y Howley PM eds. *Fields Virology*. Fourth edition. Vol. 1. New York: Lippincott Williams & Williams; 2001. p. 799-840.
- Krah D, Amin R, Nalin D, Provost P. A simple antigen-reduction assay for the measurement of neutralizing antibodies to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 1991;163:634-7.
- Zhan J, Vallbracht A, Flehmig B. Hepatitis A-virus in cell culture. V. Neutralizing antibodies against hepatitis A-virus. *Med Microbiol Immunol* 1984;173:9-17.
- Flehmig B, Haage A, Pfisterer M. Immunogenicity of hepatitis A virus vaccine. *J Med Virol* 1987; 22:7-16.
- Pellegrini V, Fineschi N, Matteucci G, Marsili I, Nencioni L, Puddu M, et al. Preparation and immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine* 1993;11:383-7.
- Beales LP, Wood DJ, Minor PD, Saldanha JA. A novel cytopathic microtitre plate assay for hepatitis A virus and anti-hepatitis A neutralizing antibodies. *J Virol Methods* 1996; 59:147-54.
- Lemon S, Murphy P, Shields P, Ping L, Feinstone S, Cromeans T, et al. Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J Virol* 1991;65:2056-65.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938;27:493-7.
- de la Cruz VF, Lal AA, McCutchan F. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J Biol Chem* 1988;263:4318-22.
- Finney DJ. *Probit analysis*. 3<sup>rd</sup> edition. Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
- Deroo S, Muller CP. Antigenic and immunogenic phage displayed mimotopos as substitute antigens: applications and limitations. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 2001;4:75-110.

---

## In vitro neutralization assay to evaluate new hepatitis A vaccine candidates

### Abstract

Immunity to hepatitis A virus (HAV) is in first instance due to neutralizing antibodies. Neutralization assays are essential to evaluate new candidate vaccines against this pathogen. In this paper, an *in vitro* neutralization assay to evaluate HAV vaccine candidates using phage–display technology is described.  $10^3$  and  $10^2$  DICT<sub>50</sub> of HAV were incubated with different antibodies preparations and were inoculated onto plates with FRhK4 cells. After seven days of incubation, the neutralizing titer was determined as reciprocal of the serum dilution reducing HAV growth (inhibition of CPE) by 50%.  $10^3$  and  $10^2$  DICT<sub>50</sub> were neutralized by 7E7 anti-HAV monoclonal antibody and anti-VHA positive human sera (A12 and A31). Negative controls of the assay did not neutralize viral infectivity. Sera from mice immunized with phages displaying VHA mimotopes had neutralizing titers from 4 – 16. Neither negative control nor pre-immune and sera from mice immunized with M13 wild type phage neutralized HAV. A simple and faster *in vitro* neutralization assay was developed to evaluate new HAV vaccine candidates.

**Keywords:** HAV, neutralization, mimotope, immunogenicity, phages.

---

Recibido: Octubre de 2009

Aceptado: Diciembre de 2009