

Artículos originales cortos

Estudio de la especificidad del sistema RECVIH para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 y el VIH-2

J. BENÍTEZ, V. LEAL y L.I. NOVOA

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en febrero de 1991

Aprobado en julio de 1991

RESUMEN

La especificidad constituye uno de los parámetros más importantes que deben considerarse en los sistemas de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra el VIH. En el presente trabajo se analiza la especificidad del sistema RECVIH KS-04, que emplea proteínas recombinantes del VIH-1 y VIH-2, frente a un panel de 1 313 individuos. Además de la especificidad del sistema en general, se analiza su asociación a factores como sexo, edad, color de piel y estado de salud. El valor de especificidad obtenido fue de 99,1%, no pudiéndose demostrar la existencia de diferencias significativas en la población analizada. Se obtuvieron dos resultados positivos, que fueron posteriormente confirmados como individuos VIH seropositivos, así como otro caso que pudiera estar infectado por VIH-2.

SUMMARY

Specificity constitutes one of the most important parameters to bear in mind regarding diagnostic systems for the detection of antibodies against HIV. The present paper analyses the specificity of the RECVIH KS-04 which employs HIV-1 and HIV-2 recombinant proteins, faced to a panel of 1313 individuals. In addition to the system specificity in general terms, it is also analyzed in connection to its linkage to age, sex, race and health condition. The specificity value obtained was 99.1% and no significant difference could be demonstrated in the analyzed population. Two positive results were obtained and confirmed afterwards as sero positive cases as well as another who could be infected by HIV-2.

INTRODUCCION

Hasta el momento, dos miembros de la familia de los retrovirus, el VIH-1 y el VIH-2, han sido caracterizados como los agentes etiológicos del SIDA (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Clavel *et al.*, 1986). El VIH-1 se ha encontrado prácticamente en todas las regiones geográficas, mientras que el segundo se ha aislado hasta el momento, inicialmente en países de Africa occidental y, posteriormente, en algunos países de América y Europa (Brucker *et al.*, 1987; Cortés *et al.*, 1989; Kroegel *et al.*, 1987; Anónimo, 1988).

En los últimos años ha alcanzado gran auge el desarrollo de sistemas para el diagnóstico de la infección por VIH. Entre ellos, los más utilizados son los ensayos inmunoenzimáticos para la detección de anticuerpos, conformados sobre placas de 96 pocillos, los que se caracterizan por altos niveles de sensibilidad y especificidad. Este último constituye uno de los parámetros de mayor importancia a tener en cuenta durante la evaluación de estos sistemas (Anónimo, 1987), por cuanto las

muestras con resultado positivo son reanalizadas con el mismo sistema u otro similar, y de mantenerse la positividad, se procede a realizar una prueba con alguno de los métodos confirmatorios, de los cuales el más empleado es el *Western blot* (WB) (Anónimo, 1987).

Esto trae como consecuencia, en primer lugar, que se deseche la sangre de los donantes que hayan resultado "falsos positivos" en el análisis, y en segundo lugar, un aumento considerable en el costo de la determinación, especialmente si se llega a utilizar el WB. En este último sistema se obtienen también frecuentemente resultados falsos positivos en virtud de la reactividad a las células en que el virus es cultivado (Saags *et al.*, 1986; Roy *et al.*, 1987).

La fuente de antígeno utilizada en los sistemas tipo ELISA es de vital importancia y estos se clasifican teniendo en cuenta ese parámetro en sistemas que emplean antígeno de cultivo viral, proteínas recombinantes y péptidos sintéticos.

Los pertenecientes a las dos últimas clases exhiben una sensibilidad comparable a aquellos que emplean lisado viral (también llamados *de primera generación*) y una superior especificidad (Navarro *et al.*, 1988), garantizada por la ausencia de contaminantes en las preparaciones finales de las proteínas recombinantes y en mayor grado aun, por los péptidos sintéticos (Anónimo, 1989).

En el presente trabajo se estudia la especificidad del sistema diagnóstico RECVIH KS-04 que utiliza proteínas recombinantes para la detección combinada de anticuerpos contra ambos agentes causales del SIDA, el VIH-1 y el VIH-2.

MATERIALES Y METODOS

Muestras

Las 1 364 muestras de suero analizadas, que incluyen 51 individuos VIH-1 seropositivos, fueron colectadas en volumen de 3 ml y almacenadas a -20°C hasta el momento en que se realizó la prueba. Estas se clasificaron según se representa en la tabla 1.

Todas las muestras de donantes de sangre y enfermos fueron analizadas previamente con un sistema de ELISA competitivo (DAVIH) producido a partir de lisado viral en el Laboratorio Nacional de Referencia de Cuba (LNR). En la categoría de enfermos se incluyen 30 casos positivos a la prueba de detección de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, así como 14 casos de enfermedades autoinmunes.

Las muestras correspondientes a individuos seropositivos al VIH, fueron suministradas por el LNR, y habían sido confirmadas por WB utilizando para esto el sistema DAVIH-BLOT de la misma procedencia.

Tabla 1
CLASIFICACION DE LAS MUESTRAS DE SUERO UTILIZADAS

Clasificación	N
I) VIH seronegativos	1 313
a) Donantes de sangre	1 134
b) Enfermos	179
- E. autoinmunes	14
- Hepatitis	30
- Otras	135
II) VIH seropositivos	51
Total	1 364

Determinación de anticuerpos

Las muestras de suero fueron estudiadas mediante el sistema RECVIH KS-04, el cual emplea en calidad de antígeno fijado a la fase sólida, proteínas recombinantes que contienen segmentos representativos de la gp41 y p24 del VIH-1 y la gp36 del VIH-2, obtenidos en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Benítez *et al.*, 1989). Los antígenos empleados en el diagnóstico fueron obtenidos por técnicas de ingeniería genética que comprenden el uso de la bacteria *E. coli* en la que se

alcanzaron niveles de expresión mayores de 15%. Las proteínas obtenidas, que fueron purificadas por cromatografía de alta presión hasta un nivel de pureza superior al 95%, fueron fijadas a las placas de poliestireno (Immuno Modules F12, A/S NUNC Roskilde Denmark) mediante la incubación en 0,5 M de *buffer carbonato de sodio* pH=9,6 a 37°C.

El ensayo consistió en la incubación de 5 µl de cada muestra con 100 µl del *buffer conjugado muestra* (PBS 1X, 0,05% Tween-20) a 37°C por espacio de 30 minutos. Luego de cuatro lavados con 200 µl del mismo *buffer*, se adicionó 100 µl por pocillo del *conjugado enzima anticuerpo* [(antilgG(h)-Peroxidasa) (Sigma Chemical Co., p8375)] y se incubó a 37°C por espacio de 30 minutos. Finalmente se lavaron las placas como en el paso anterior y se incubaron con 100 µl del *sustrato* (*buffer citrato fosfato* pH=5,5, 0,014% H₂O₂ (BDH Chemical Ltd, n10366), 0,25% OPD (Sigma Chemical Co., p1256) por 10 minutos a temperatura ambiente, protegiendo las placas de la luz directa.

La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl por pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M y se leyó la absorbancia (Abs.) a 4920 Å.

En cada placa se analizaron 92 muestras y se incluyeron además dos réplicas de cada uno de los controles positivo y negativo.

Cálculos

En la distribución de la población de valores de Abs. computados para los *controles negativos* se obtuvo un recorrido de 0,14 (0,08-0,22), mientras que para los *controles positivos* el recorrido fue de 0,6 (0,9-1,5). Esto trae como consecuencia una alta variabilidad en los valores obtenidos para el *cut off* que según se expresa en (1) es directamente proporcional al valor medio de Abs. obtenido para el *control negativo* en la correspondiente placa:

$$Cut\ off = 1,8 \cdot < Abs\ (CN) > \quad (1)$$

Con el objetivo de normalizar los datos provenientes de diferentes corridas, en lugar del valor de Abs. se empleó como fuente de datos la expresión Ω definida como el cociente del valor de Abs. obtenido para cada muestra y el valor límite (*cut off*) calculado para la correspondiente corrida (2). De esta forma se disminuyó en 10% el coeficiente de variación dentro de las poblaciones analizadas:

$$\Omega(i,j) = \frac{Abs.(i)}{Cut\ off(j)} \quad (2)$$

i: número de la muestra
j: número de la corrida

Los resultados del cómputo del parámetro Ω se analizaron para los 1313 sueros caracterizados como VIH-1 negativos, teniendo en cuenta la edad, sexo, color de la piel, clasificación según donantes de sangre, enfermos en general, pacientes de enfermedades autoinmunes y positividad al análisis para detectar antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

RESULTADOS Y DISCUSION

Teniendo en cuenta los valores de Ω obtenidos para las muestras negativas y positivas se computaron los histogramas de distribución de estas poblaciones (figura 1). En los mismos se muestra que ambas categorías son perfectamente distinguibles, aunque se observan algunos individuos caracterizados como negativos, para los que se obtuvieron valores de Ω mayores que 1,00. En el caso de los sueros VIH-1 positivos, se obtuvo para todos, valores de Ω mayores que 1; siendo el valor mínimo de 1,10 (Abs. = 0,45).

En lo que respecta al resto de las categorías analizadas, como se puede apreciar en la tabla 2, no se encontraron para α = 0,05 diferencias significativas entre los valores medios obtenidos para Ω en cada una de las poblaciones, a diferencia de lo reportado anteriormente para otro sistema diagnóstico (Cockerill *et al.*, 1987). Se obtuvieron similares valores de Abs. con el sistema RECVIH KS-04 para los diferentes grupos que se diferencian por sexo, color de la piel, donantes de sangre o individuos enfermos.

En el estudio por edades se dividieron los individuos en 6 grupos, cuatro de los cuales cubren intervalos de 10 años y los otros dos representan las personas con menos de 20 y más de 60 años. Los resultados

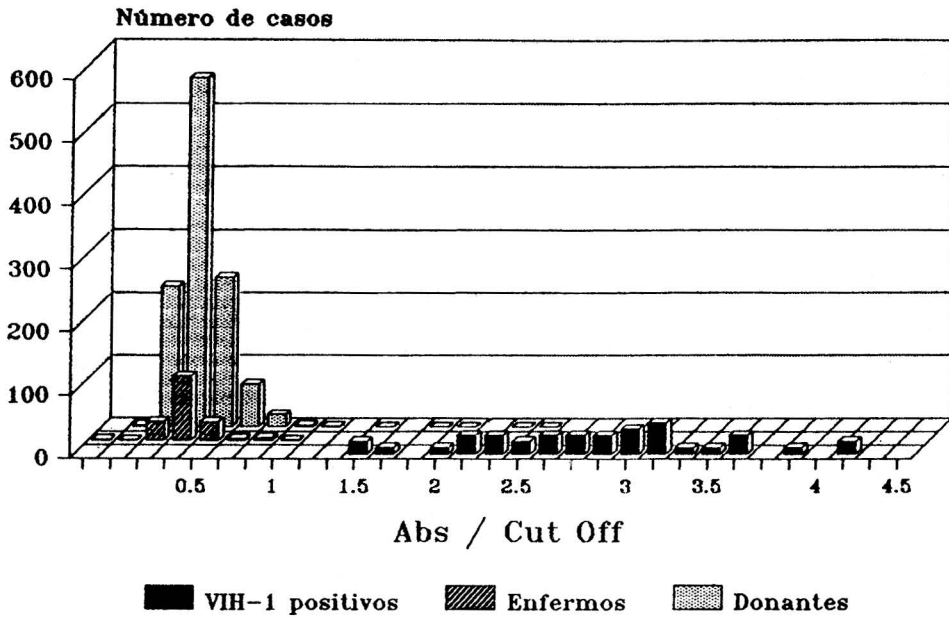


FIG. 1. Histograma de los valores de Abs./Cut off.

Tabla 2
VALORES MEDIOS DE Ω Y DESVIACIONES ESTANDAR (S) OBTENIDOS EN LOS DIFERENTES GRUPOS POBLACIONALES

Grupo	N	Ω	S
Donantes	1 134	0,44	0,13
Enfermos	179	0,43	0,14
(t = 0,01)			
E. Autoinmunes	14	0,50	0,18
(t = 1,24)			
HBsAg +	30	0,43	0,17
(t = 0,07)			
HIV (+)	51	2,06	1,27
(t = 9,11)			
Hombres	1 098	0,44	0,19
Mujeres	215	0,42	0,16
(t = 1,44)			
Blancos	769	0,41	0,13
Mestizos	544	0,45	0,17
(t = 1,96)			

Tabla 3
VALOR MEDIO DE Ω Y DESVIACION ESTANDAR OBTENIDOS PARA LAS MUESTRAS NEGATIVAS
EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE EDADES

Grupo	N	Ω	S
Menores de 20	66	0,49	0,10
21-30	583	0,42	0,18
31-40	351	0,43	0,15
41-50	189	0,41	0,14
51-60	73	0,43	0,18
mayores de 60 (F = 2,54)	51	0,43	0,12

obtenidos, como se refleja en la tabla 3, no arrojan diferencias significativas entre los diferentes grupos de edades para $\alpha = 0,05$.

El análisis de la especificidad del sistema se realizó de la misma forma, teniendo en cuenta los parámetros anteriormente expuestos. En este caso (tabla 4), los resultados obtenidos fueron similares para las categorías analizadas, no encontrándose diferencias marcadas en ninguno de los grupos respecto al grupo de donantes de sangre. El valor mínimo de especificidad (96,7%) se obtuvo para el grupo de los

individuos positivos a HBsAg, sin embargo, esto puede deberse al bajo número de muestras analizadas en este caso. Este resultado es necesario corroborarlo con un número mayor de casos para garantizar la validez estadística. En cuanto a los diferentes grupos de edades, la especificidad varió entre 96,8 y 100%. Para los individuos con trastornos autoinmunes no se obtuvieron resultados "falsos positivos".

En general, de los 1 313 sueros de donantes de sangre y enfermos analizados, se obtuvieron 11 casos positivos por el

Tabla 4
ESPECIFICIDAD OBTENIDA PARA EL SISTEMA RECVIH KS-04
EN LOS DIFERENTES GRUPOS POBLACIONALES

Grupo	N	RECVIH (+)	Esp. (%)
Donantes	1 134	8	99,3
Enfermos	179	3	98,3
Hombres	1 098	7	99,4
Mujeres	215	4	98,1
Blancos	769	2	99,7
Mestizos	544	9	98,3
HBsAg+	30	1	96,7
E. Autoinmunes	14	0	100,0
Total	1 313	11	99,1

sistema REC VIH KS-04, lo que representa una especificidad de 99,1%. Los resultados obtenidos para estos sueros se muestran en la tabla 5, en la que se puede apreciar que para cuatro de estas muestras los valores de Ω se mueven en un rango entre 1,0 y 1,05, o sea, a un nivel inferior al valor mínimo alcanzado para una muestra VIH positiva. Esto sugiere que el sistema puede incrementar aún su especificidad mediante un mejor ajuste del valor límite, ya sea por medio de la inclusión del *control positivo* en la formulación matemática para calcular el *cut-off*, y/o aumentando la reproducibilidad del sistema.

Para otras dos muestras (n847 y n696) los valores obtenidos, aunque cercanos al *cut-off*, se sobrelapan con una cola de la población de valores de Ω obtenida para los individuos VIH positivos. Las cinco muestras

Tabla 5
RESULTADOS POSITIVOS CON REC VIH KS-04

Número	Abs.	Ω
101	0,22	1,02
1 304	0,20	1,02
1 308	0,20	1,02
744	0,15	1,04
847	0,31	1,15
696	0,16	1,18
1 140*	0,42	1,37
819**	0,48	1,78
467**	0,41	2,07
705*	0,31	2,15
816*	0,66	2,44

* Valores de Ω característicos de muestras positivas analizadas por REC VIH KS-04

** Individuos que resultaron positivos en el análisis con el sistema DAVIH.

restantes corresponden a donantes de sangre. Las muestras n819 y n467 resultaron positivas a VIH-1 con el sistema DAVIH.

Teniendo en cuenta que en Cuba se ha detectado un índice de seropositividad a VIH-1 menor de 0,04% teniendo como base la población en general, la probabilidad de encontrar un individuo positivo dentro de la muestra poblacional analizada sería de 0,4% con el posible error inherente al método de estimación. Sin embargo, para las muestras n705, n816 y n1140 se obtuvieron valores de Abs. característicos en los sueros positivos (especialmente el n816), lo que pudiera indicar la posible presencia de anticuerpos contra la proteína gp36 del VIH-2 en alguno de los casos. Esto sería necesario comprobarlo con un sistema para la detección de antiVIH-2, ya sea ELISA, WB u otro similar. El sistema DAVIH utilizado para analizar en paralelo las muestras, pudiera no haber detectado algún caso VIH-2 positivo, por cuanto emplea antígeno viral de VIH-1 y se ha encontrado que la mayoría de los sistemas de este tipo muestran una sensibilidad que varía entre 5 y 95% para VIH-2 (Denis *et al.*, 1988).

Entre las muestras de enfermos se encontraban, además de los 30 casos HBsAg positivos, 14 individuos con afecciones de origen autoinmune. En estos momentos se está ampliando este estudio con mayor número de individuos de ambos grupos, así como con personas infectadas con el virus de la hepatitis C, con el objetivo de estimar el posible grado de interferencia que puedan representar estas muestras y, por lo tanto, la pérdida de especificidad que este fenómeno signifique para el sistema diagnóstico.

El valor de especificidad (99,1%) obtenido para el sistema RECVIH KS-04 es similar a lo reportado para otros sistemas que emplean proteínas recombinantes en calidad de antígenos, para los que se han encontrado valores de especificidad mayores de 99% en cuanto a muestras doblemente reactivas se refiere (Craske *et al.*, 1990). Así mismo se han reportado valores de especificidad para diferentes sistemas de diagnóstico anti-VIH que fluctúan entre 97 y 99,9% (Scheffel *et al.*, 1990, Constantine *et al.*, 1989, Ayres *et al.*, 1990).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el sistema RECVIH KS-04 presenta un alto nivel de especificidad, similar al exhibido por otros sistemas de diagnóstico. Esto permite la realización del pesquisaje con vistas a detectar anticuerpos contra VIH, disminuyendo considerablemente el problema de los "falsos positivos" que pueden presentarse cuando se utilizan sistemas de primera generación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Francis Norniella y Luis Arzuaga el trabajo realizado en el análisis de las muestras.

REFERENCIAS

- ANONIMO (1988). HIV-2 detected in UK. *Nature* 332: 295.
- ANONIMO (1987). Report of the WHO meeting on criteria for the evaluation and standardization of diagnostic test for the detection of HIV antibody. Stockholm, December 17-18, 1987. *Document WHO/GPA/BMR/88.1*.
- ANONIMO (1989). Report of the WHO workshop on synthetic peptides in HIV diagnosis and AIDS-related research. Moscow, may 26-29, 1989. *Document WHO/GPA/BMR/89*.
- BARRE-SINOUSSE, F.; J.C. CHERMANN; F. REY; M.T. NUGUYBE; S. CHAMARET; J. GRUEST; C. DAUGET; C. AXLER-BLIN; F. BRUN-VEZINET; C. ROUZIQUX; W. ROZEMBAUM y L. MONTAGNIER (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-870.
- AYRES, L.; F. AVILLEZ; A. GARCIA-BENITO; F. DEINHARDT; L. GÜRTLER; F. DENIS; G. LEONARD; S. RANGER; P. GROB; H. JOLLER-JEMELKA; G. HESS; S. SEILD; H. FLACKE; F. SIMON; F. BRUN-VEZINET; D. SONDAG; A. ANDRE; H. HAMPL; R. SCHOEN; S. STRAMER y H. TROONEN (1990). Multicenter evaluation of a new recombinant enzyme immunoassay for the combined detection of antibody to HIV-1 and HIV-2. *AIDS* 4: 131-138.
- BENITEZ, J.; L.I. NOVOA; J. MACHADO; J. GARCIA; G. PADRON y L. HERRERA (1989). Development of two diagnostic systems using two recombinant antigens. *V International Conference on AIDS*, Montreal, June 4-9, 1989: 368.
- BRUCKER, G.; F. BRUN-VEZINET; M. ROSENHEIM; M.A. REY; C. KATLAMA y M. GENTILINI (1987). HIV-2 infection in two homosexual men in France. *Lancet*, i: 223.
- CLAVEL, F.; D. GUETARD; F. BRUN-VEZINET; S. CHAMARET; M.A. REY; M.O. SANTOS-FERREIRA; A.G. LAURENT; C. DAUGET; C. KATLAMA; C. ROUZIQUX; D. KLATZMANN; J.L. CHAMPLAUMAUD y L. MONTAGNIER (1986). Isolation of a new retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 223: 343-346.
- COCKERILL, F.R.; R.S. EDSON; R.C. CHASE; J.A. KATZMANN y H.F. TASWELL (1987). False positive antibodies to human immunodeficiency virus (HIV) detected by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in patients at low risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *III International Conference on AIDS*. Washington DC, June 1-5, 1987: 34.
- CONSTANTINE, N.T.; E. FOX; E.A. ABBATTE y J.N. WOODY (1989). Diagnostic usefulness of five screening assays for HIV in an East African city where prevalence of infection is low. *AIDS* 3: 313-317.
- CORTES, E.; R. DETELS y D. ABOLAFIA (1989). HIV-1, HIV-2 and HTLV-I infection in high-risk groups in Brazil. *New England Journal of Medicine* 320: 953-958.

- CRASKE, J.; A. TURNER; R. ABBOTT; M. COLLIER; H.H. GUNSON; D. LEE; V. MARTLEW; P. HOWELL y E. LOVE (1990). Comparison of false positive reactions in direct-binding anti-HIV ELISA using cell lysate of recombinant antigens. *Vox Sanguinis* 59: 160-166.
- DENIS, F.; G. LEONARD; A. SANGARE; G. GERSHY-DAMET; J.L. REY; B. SORO; D. SCHMIDT; M. MOUNIER; M. VERDIER; A. BAILLOU y F. BARIN (1988). Comparison of 10 enzyme immunoassays for the detection of antibody to human immunodeficiency virus type 2 in West African sera. *Journal of Clinical Microbiology* 26(5): 1000-1004.
- KROEGEL C.; G. HESS; K.H. MEYER ZUM BUSCHENFELDE; D. VITEECOQ; F. FERCHAL y S. CHAMARET (1987). Routes of HIV-2 transmission in Western Europe. *Lancet*, i: 868-869.
- NAVARRO, M.D.; J.A. PINEDA; M.A. VELARDO; F. GARCÍA DE PESQUERA; M. LEAL y L.E. LISSEN (1988). Recombinant EIA for anti-HIV testing is more specific than conventional EIA. *Vox Sanguinis* 54: 62-63.
- ROY, S.; J. PORTNOY y M.A. WAINBERG (1987). Need for caution in interpretation of Western blot test for HIV. *JAMA* 257: 1047.
- SAAG, M.S. y J. BRITZ (1986). Asymptomatic blood donor with a false positive HTLV-III Western blot. *New England Journal of Medicine* 314: 118.
- SCHEFFEL, J.W.; D. WIESNER; A. KAPSALIS; D. TRAYLOR y A. SUAREZ (1990). Retrocell HIV-1 passive hemagglutination assay for HIV-1 antibody screening. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 3: 540-545.