

Desarrollo de un ensayo de segunda generación para la detección de anticuerpos contra el VIH-1

L.I. NOVOA; J. MACHADO; J. BENÍTEZ; J. GARCÍA; E. NARCIANDI; G. PADRÓN; E. PENTÓN y L. HERRERA

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

Recibido en noviembre de 1991

Aprobado en marzo de 1992

RESUMEN

Las proteínas p24 (gag) y gp41 (env) del VIH-1, fueron clonadas y expresadas en *E. coli*. Los antígenos recombinantes altamente purificados fueron enfrentados a un panel de 1 201 muestras de suero humano que incluyen 115 muestras de individuos VIH-1 positivos. Finalmente se desarrolló un sistema de ELISA con una mezcla de ambas proteínas. La sensibilidad y especificidad del test fueron 100 y 98,7% respectivamente. El alto valor de sensibilidad obtenido para este sistema lo convierte en un método efectivo para el pesquisaje de la sangre en la detección de anticuerpos contra el VIH-1.

SUMMARY

The p24 (gag) and gp41 (env) HIV-1 proteins were cloned and expressed in *E. coli*. Highly purified recombinant antigens were assayed against a panel of 1 201 human sera, which includes 115 samples from HIV-1 positive individuals. Finally we developed an ELISA test with a mixture of both proteins. The sensitivity and specificity of the test were 100 and 98.7% respectively. The high value obtained for the sensitivity of this system makes it an effective method for the screening of the blood for the detection of anti-HIV-1 antibodies.

INTRODUCCION

Desde que el SIDA fue reconocido en 1981 y posteriormente identificado el VIH como agente etiológico de la enfermedad, se han desarrollado diversos ensayos para detectar la infección por este virus.

Los mayores esfuerzos realizados en los últimos años han estado encaminados a la obtención de métodos diagnósticos cada vez más sensibles, específicos, de fácil manipulación y de rápida realización (Carlson *et al.*, 1987; Quinn *et al.*, 1988; Riggin *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 1987; Siitari *et al.*, 1990). Los métodos generalmente utilizados para la detección de anticuerpos contra el VIH son los ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA, que emplean tanto antígenos virales (Petricciani, 1985) como proteínas recombinantes (Thorn, 1987) y/o péptidos sintéticos.

Los ensayos que se basan en la utilización de proteínas obtenidas por ingeniería genética exhiben tan alta sensibilidad como aquellos que emplean antígeno viral, con la ventaja de no ver afectada su especificidad por la reacción a las células en las que el virus es cultivado (Navarro *et al.*, 1988).

El empleo de proteínas recombinantes en los sistemas de diagnóstico trae consigo, por otra parte, la aparición de resultados falsos positivos que no están vinculados, en la mayoría de los casos, a resultados indeterminados en *Western blot* (WB)

basados en el uso de antígeno viral y que se deben al propio sistema de expresión (comúnmente *E. coli*) empleado (Craske *et al.*, 1990).

En el presente trabajo se describe la obtención por la vía del ADN recombinante, de dos de las proteínas del VIH-1 de interés para el diagnóstico (gp41 y p24) y el estudio de su utilidad en la detección de anticuerpos contra el VIH por un método inmunoenzimático.

MATERIALES Y METODOS

Plasmidios recombinantes

Los genes que codifican para las proteínas gp41 y p24 del VIH se clonaron bajo el control del promotor triptófano de *E. coli* y como señal de terminación se empleó la del fago T4 (Estrada *et al.*, 1988) con algunas modificaciones (resultados no publicados), dando lugar a los plasmidios recombinantes pHIVTA y pHIVCA que portan los genes codificadores para la proteína transmembránica p41 (env) y la proteína p24 (gag) respectivamente.

Cepas bacterianas

MC1061 (F- HsdR ara- leu galV galK lacX674 rps131 strA).

W 3110 (F- supF supE HsdR galR galK trpR metB lacY tonA).

HB 101 (RecA pro leu [r- m-]).

JA 221 (Hso m+ HsdV- lac leuB6 trpE).

Cultivo e inducción

La cepa HB101 de *E. coli* K12 transformada con el plasmidio pHIVTA (p41r) se creció en un precultivo de 5 mL de medio LBA suplementado con triptófano, a una concentración de 100 µg/mL durante 12 horas a 37°C. Este precultivo se utilizó como preinóculo de un fermentador con cinco litros de medio mínimo salino, suplementado con MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,1 mM, glucosa 0,5%, hidrolizado de caseína 1%, ampicilina 50 µg/mL y triptófano 10 µg/mL. Después de una hora de crecimiento, el cultivo se indujo mediante la adición de 20 µg/ml de ácido indolacrilico. Posteriormente se incubó a 37°C durante 12 horas. La cepa JA221 se empleó como

hospedera para el plasmidio pHIVCA (p24r) y la inducción, en lo fundamental, transcurrió como la precedente.

Purificación de antígenos

Ambos antígenos se purificaron mediante las técnicas de lavados sucesivos del precipitado celular, siguiendo la misma estrategia aplicada para otras proteínas insolubles expresadas en *E. coli* (Devos *et al.*, 1983; Marston *et al.*, 1984; Schoner *et al.*, 1985; Marston *et al.*, 1986) con algunas modificaciones entre las cuales se encuentra la utilización de un disruptor tipo politrón para la homogeneización de los precipitados obtenidos en los diferentes pasos, así como lavados del precipitado celular.

La purificación ulterior se llevó a cabo por técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando para la p41r una columna TSK 3 000 SW (Baker) de gel filtración y para la p24r un sistema de fase inversa con columna de poro ancho de butyl C15 (Baker) y como solventes una mezcla de acetonitrilo-ácido trifluoroacético. La determinación de proteínas se efectuó utilizando la técnica descrita por Lowry *et al.*, 1951.

Suero de carnero anti *E. coli*

Los carneros fueron inmunizados con una primera dosis de 400 µg de extracto de *E. coli* con adyuvante completo de Freund, a los 22 días se suministró una segunda dosis de 400 µg del mismo material con adyuvante incompleto de Freund (AIF) y la tercera dosis se aplicó a los 45 días de la primera en AIF, con la fracción de *E. coli* no adsorbida a una columna de afinidad montada con anticuerpos de carnero obtenidos de los sueros de las inmunizaciones precedentes, acoplados a Sepharose 25r1 CL-4B activada con bromuro de cianógeno. Las inmunizaciones se controlaron por inmunodifusión radial (Ouchterlony *et al.*, 1978) y por *Western blot* (Towbin *et al.*, 1979; Burnette *et al.*, 1981).

Inmunodot con suero humano anti-VIH y suero de carnero anti-*E. coli*

El inmunodot cruzado con suero humano anti VIH y suero de carnero anti *E. coli* se realizó aplicando 100 µL de cada fracción cromatográfica sobre una membrana de nitrocelulosa 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Dasell). La membrana se bloqueó con 5% de leche descremada en PBS, incubando 30 min a 37°C. Después de incubar 60 min a la misma temperatura, con el suero diluido 1:10, se lavó con PBS-Tween-20 0,05% (PBS-T) por espacio de 15 min

y a continuación se incubó a temperatura ambiente con un conjugado de proteína A-oro coloidal hasta la aparición de la señal.

Muestras

Fueron analizadas en total 1 201 muestras de suero, que incluyen 1 086 donantes de sangre VIH negativos y 115 individuos VIH positivos. Los sueros humanos positivos en la determinación de anticuerpos contra VIH, fueron confirmados por WB. Las muestras caracterizadas como negativas fueron previamente analizadas con un sistema de ELISA competitivo basado en el uso de antígeno proveniente de cultivo viral (DAVIH, Laboratorio Nacional de Referencia de Cuba). Como controles positivos y negativos se emplearon mezclas de sueros humanos caracterizados por WB como VIH(+) y VIH(-) respectivamente.

Conjugado de peroxidasa con inmunoglobulinas de carnero contra IgG humana

Las inmunoglobulinas de carnero contra IgG humana se conjugan a la peroxidasa de rábano tipo-VI (Sigma p8375, St.Louis,MO) por una modificación del método del peryodato de sodio (Wilson *et al.*, 1978). Las modificaciones fundamentales consistieron en la sustitución de los pasos de diálisis por cambio de buffer en columnas de tamizaje molecular de G-25 (Pharmacia 17-0033-01, Uppsala, Sweden). Esto permite la reducción del proceso de conjugación en 24 horas (datos no publicados).

Ensayo inmunoenzimático

Las placas de microELISA (Immuno Modules F16, A/S NUNC Roskilde Denmark) fueron sensibilizadas con los antígenos recombinantes p41r y p24r, mediante la incubación de 1 μ g por pocillo de cada antígeno en 0,5 M de buffer carbonato de sodio pH=9,6 a 37°C. Fueron desarrollados tres ensayos diferentes que incluyen la sensibilización de las placas con una mezcla de ambas proteínas y con estas por separado.

El ensayo inmunoenzimático comprende la incubación durante 30 min de 5 μ L de cada una de las muestras a analizar, así como de los controles positivo y negativo con 100 μ L de PBS-T a 37°C. Luego de cuatro lavados con 200 μ L por pocillo del mismo buffer, se adicionaron 100 μ L por pocillo del conjugado antiIgG(h)-peroxidasa y se incubó a 37°C. Finalmente se lavaron nuevamente las placas y se

reveló la reacción mediante la incubación 10 min a 22°C con 100 μ L por pocillo de la solución de sustrato (buffer citrato-fosfato pH=5,5, H₂O₂ 0,014%, OPD 0,25%. La reacción se detuvo con 50 μ L; de ácido sulfúrico 2,5 M y se leyó la Abs. a 492 nm. En cada placa se incluyeron 2 réplicas de cada uno de los sueros controles positivo y negativo.

RESULTADOS

Para la obtención de las proteínas gp41 y p24 en bacterias se realizó la clonación de los genes que codifican para cada una de ellas bajo el promotor triptófano y la señal de terminación de la transcripción del fago T4. Los resultados de la clonación y optimización de la expresión de las proteínas p41r y p24r del VIH-1 en *E. coli* se muestran en un trabajo que actualmente se encuentra en preparación. De estos resultados se tomaron las mejores condiciones con las que se obtenían para ambas proteínas recombinantes niveles de expresión de entre 15 y 20% (figura 1).

En el proceso de purificación, con los diferentes lavados salinos sucesivos del precipitado celular se obtuvo un material que representó 1/10 del peso de la biomasa húmeda celular inicial, lográndose como resultado de estos procesos aproximadamente 60% de pureza para cada una de las proteínas recombinantes (figura 1). Los pasos finales de purificación se realizaron por HPLC. Las fracciones obtenidas en ambos casos fueron caracterizadas por Inmunodot con sueros humanos positivos para anticuerpos contra el VIH y con suero de carnero anti *E. coli*, con título de 1/64 por inmunodifusión radial y reconocimiento de las proteínas de *E. coli* por WB. La actividad antigénica se obtuvo para las fracciones correspondientes al pico mayoritario de los cromatogramas de cada una de estas proteínas (fracc. 4-7 para p41r, fracc. 2-6 para p24r) (figura 2).

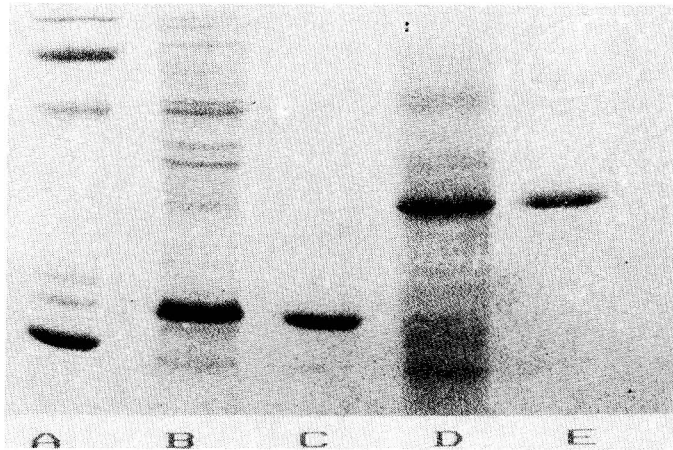


FIG. 1. Perfil electroforético obtenido para las proteínas recombinantes: A) Patrón de peso molecular (14, 18, 21, 43, 67 y 93 kD); B) p41r, biomasa; C) p41r, fracción colectada de GF-HPLC; D) p24r, biomasa; E) p24r, fracción colectada de RP-HPLC.

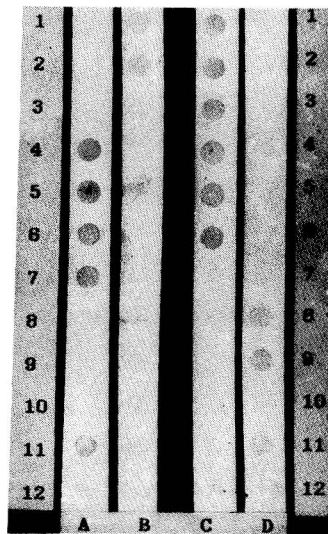


FIG. 2. Inmunodot realizado con las proteínas recombinantes: A) p41r con suero antiHIV; B) p41r con suero anti-*E. coli*; C) p24r con suero antiHIV; D) p24r con suero anti *E. coli*.

Los histogramas correspondientes a la distribución en ELISA de las muestras estudiadas con las proteínas p24r y p41r por separado se representan en la figura 3. En el caso de la p24r (figura 3a) se aprecia que para un número de muestras VIH(+) se obtienen valores de Abs. que oscilan entre

0,2 y 0,4, lo que hace que se sobrelapen con los valores más altos obtenidos para las muestras VIH(-).

A diferencia de esto, tanto en el caso de la p41r (figura 3b), como en el de la combinación p41r-p24r (figura 4), se observa una distribución bimodal donde se

obtienen para todas las muestras VIH(+) valores de Abs. mayores que 0,35. En el histograma se observa que en el caso de la

proteína p41r por separado la diferenciación de las poblaciones normal y patológica es aún más clara.

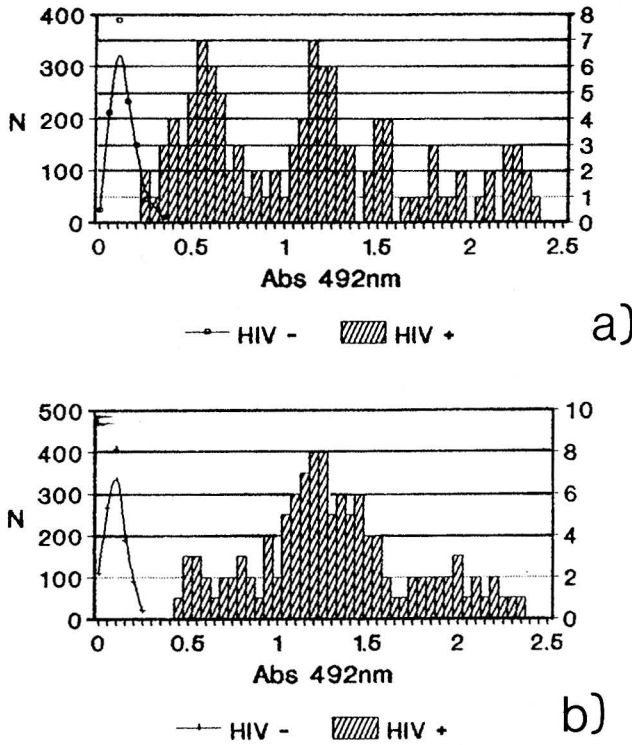


FIG. 3. Distribución de los valores de Abs. obtenidos para las muestras normales y VIH(+) en el testaje de las mismas con (a) p24r y (b) p41r.

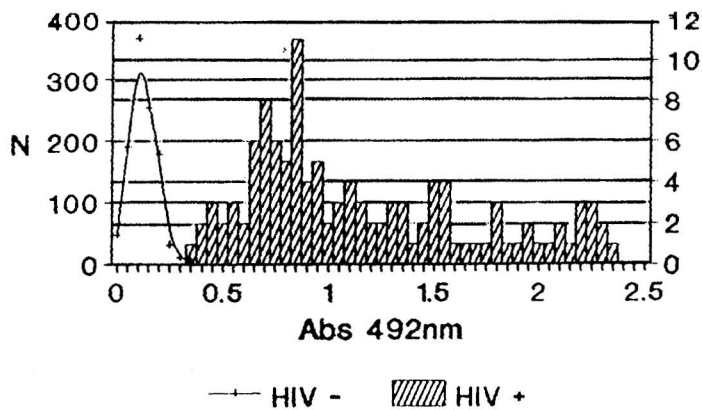


FIG. 4. Distribución de los valores de Abs obtenidos para las muestras normales y VIH(+) en el testaje de las mismas con ambas proteínas recombinantes.

Los resultados obtenidos para el sistema ELISA con la combinación de ambos antígenos recombinantes se muestran en la tabla 1. Para 16 de las 1 086 muestras VIH(-) se obtuvieron valores de Abs. mayores que el Cutoff que se calculó como el doble de la media de Abs. obtenido para ambas réplicas del suero control negativo. Este número de "falsos positivos" computa un valor de especificidad de 98,5%, el cual coincide con los valores reportados para otros sistemas de detección de anticuerpos contra VIH (Constantine *et al.*, 1989, Lepine *et al.*, 1990).

Para las 115 muestras correspondientes a individuos VIH(+) por WB los valores de Abs. se insertaron en un rango más amplio (0,35-2,35), obteniéndose 100% de concordancia de los resultados del ELISA con los del WB.

Los valores finales computados para los principales parámetros del sistema dentro de la población analizada fueron: sensibilidad = 100%, especificidad = 98,5%, valor predictivo positivo = 87,8% y valor predictivo negativo = 100%.

anticuerpos en un grupo de los individuos VIH(+), como resultado de alteraciones en la estructura de la misma motivadas por su obtención en la bacteria como cuerpo de inclusión y/o de los diferentes pasos de purificación que incluyen el empleo de solventes orgánicos. Por otra parte la no absoluta separación de las dos poblaciones analizadas puede estar causada en parte por la presencia de resultados "falsos positivos" que aparecen frecuentemente vinculados a la p24r (Meyer y Pauker, 1987), pues un grupo de valores para estas muestras sobrepasa los valores máximos obtenidos para las muestras negativas cuando fueron ensayadas con p41rec y se encuentran en el intervalo de Abs. entre 0,25 y 0,35; coincidiendo de esta forma con los valores obtenidos para los individuos débiles positivos a p24r.

A pesar de esto se estimó importante incluir la p24r en el sistema de diagnóstico a causa de la importancia que se le confiere a esta como una de las proteínas que provoca una reacción inmunológica

Tabla 1
RESULTADOS OBTENIDOS PARA LAS MUESTRAS ANALIZADAS CON EL SISTEMA BASADO EN EL USO DE AMBAS PROTEINAS RECOMBINANTES

	Resultados (+) ELISA p41 + p24	Resultados (-) ELISA p41 + p24
Muestras VIH(-) (n = 1 086)	16	1 070
Muestras VIH(+) (n = 115)	115	0
Total (n = 1 201)	131	1 070

DISCUSION

El solapamiento de las poblaciones obtenido en el caso de la p24r puede deberse en parte a un más débil reconocimiento de la proteína por los

temprana en los individuos expuestos al VIH (Sarngadharan, *et al.*, 1984; Kalyanaraman, *et al.*, 1984; Casey *et al.*, 1985; Dowbenko *et al.*, 1985). Estos resultados demuestran que el sistema ELISA empleando la p41r y p24r posee

sensibilidad y buena especificidad, lo que junto a su sencillez lo hacen útil para el empleo en los sistemas de pesquisaje para la detección de anticuerpos al VIH-1 en muestras de suero.

Con motivo de los altos valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para este sistema sería económicamente favorable utilizarlo no solamente como test primario para el pesquisaje de la sangre, sino además como un paso intermedio en el algoritmo de confirmación de los casos positivos. Esto permitiría eliminar un número considerable de los WB a realizar, descartando con el sistema ELISA un porcentaje de los individuos "falsos positivos" que hayan surgido producto al testaje primario con un sistema que emplee otra fuente de antígenos (ej. antígeno de cultivo viral). Esta posibilidad está avalada por el alto valor predictivo negativo obtenido para el sistema, que permite descartar con certeza los resultados "falsos positivos" sin el riesgo de introducir "falsos negativos". Sistemas de segunda generación han sido propuestos ya para estos fines, demostrando las ventajas económicas y operacionales de tal algoritmo (Lepine *et al.*, 1990).

En la actualidad se continúa el trabajo de análisis más detallado de la especificidad del sistema finalmente desarrollado con las proteínas p41r y p24r, en cuanto a diferentes grupos poblacionales se refiere. Además, basados en la evidencia de que es prácticamente imposible incluir en un sistema de diagnóstico todos los antígenos virales, se trabaja en la adición a este sistema de diagnóstico de otras proteínas recombinantes que incluyan los fragmentos más importantes de los principales antígenos tanto del VIH-1 como del VIH-2.

REFERENCIAS

- BURNETTE, N.N. (1981). Electrophoretic transfer of protein from SDS polyacrylamide gels to unmodified nitocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein. *A. Anal. Biochem.* **112**: 95-203.
- CARLSON, J.R.; S.C. MERTENS; J.L. YEE; M.B. ARDNER; E.J. WATSON; J. GARAYEB; M.B. JENNINGS y R.J. RIGGAR (1987). Rapid, easy and economical screening test for antibodies to human immunodeficiency virus. *Lancet* **i**: 361-362.
- CASEY, J.M.; Y. KIM y P.N. ANDERSEN (1985). Human T-cell lymphotropic virus type III: Immunologic characterization and primary structure analysis of the major internal protein p24. *Journal of Virology.* **55**: 417-423.
- CONSTANTINE, N.T.; E. FOX; E.A. ABBATTE y J.N. WOODY (1989). Diagnostic usefulness of five screening assays for HIV-1 in an East African city where the prevalence is low. *AIDS* **3**: 313-317.
- 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 or recombinant antigens. *Vox Sanguinis* **59**: 160-166.
- DEVOS, R.; G. PLACTINCK; H. CHEROUTE; G., SIMONS; W. DEGRAVE; J. TAVERNIER; E. RAMAUT y W. FIERS (1983). Molecular cloning of human interleukin-2 cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acid Res.* **11**: 4307-4322.
- DOWBENKO, D.J.; J.E. BELL y C.V. BENTON (1985). Bacterial expression of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus p24 gag protein and its use as a diagnostic reagent. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 7748-7752.
- ESTRADA, M.P.; O. HERNANDEZ y J. DE LA FUENTE (1988). Expresión directa de la hormona de crecimiento humano madura en *E. coli*. *Interferón y Biotecnología* **5**(2): 152-156.
- KALYANARAMAN, V.S.; C.D. CABRADILLA y J.P. GETCHELL (1984). Antibodies to the core protein of lymphadenopathy associated virus (LAV) in patients with AIDS. *Science* **225**: 321-323.
- LEPINE, D.; P.W. NEWMANN; S.L. FRENETTE y M.V. O'SHAUGHNESSY (1990). Evaluation of a human immunodeficiency virus test algorithm utilizing a recombinant protein enzyme immunoassay. *J Clin Microb* **28**(6): 1169-1171.

- LOWRY, O.H.; N.J. ROSEBROUGH; A.L. FARR y R.J. RANDALL (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MARSTON, F.A.O.; P.A. LOWE; M.T. DOEL; J.M. SHOEMAKER; S. WHITE y S. ANGEL (1984). Purification of calf prochymosin (prorenin) synthesized in *E. coli*. *Bio/Technology* **2**: 800-804.
- MARSTON, F.A.O.(1986). The purification of eucariotic polypeptides synthesized in *E. coli*. *Biochem. J.* **240**: 1-12.
- MEYER, K.B. y S.G. PAUKER (1987). Screening of HIV. Can we afford the false positive rate? *New England J. Medicine* **317**(4): 238-241.
- NAVARRO, M.D.; J.A. PINEDA; M.A. VELARDO; F. GARCIA 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.
- OUCHTERLONY, O.Y. y L.A. NIELSON (ed) (1978). *Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Handbook of experimental immunology.* D.M. Wier; Blackwell Scientific Publications **196**.
- PETRICCIANI, J.C. (1985). Licensed test for antibody to human T-lymphotropic virus type III: sensitivity and specificity. *Ann. Intern. Med.* **103**: 727-729.
- QUINN, T.C.; C.H. RIGGIN; R.L. KLINE; H.L. FRANCES; C.K. MULAGA; M. SENSON y A.S. FAUCI (1988). Rapid latex agglutination assay using recombinant envelope polypeptides for detection of antibody to HIV. *J. Am. Med. Assoc.* **260**: 510-513.
- RIGGIN C.H.; G.A. BELTZ; C.H. HUNG; R.M. THORN, y D.J. MARCIANI (1987). Detection of antibodies to human immunodeficiency virus by latex agglutination with recombinant antigen. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1770-1773.
- SANTOS, J.I.; B. GALVAOCASTRO; D.C. MELLO; H.G. PEREIRA y M.S. PEREIRA (1987). Dot enzyme immunoassay: a simple, cheap and stable test for antibody to human immunodeficiency virus (HIV). *J. Immunol. Methods.* **99**: 191-194.
- SARGANDHARAN, M.G.; M. POPOVIC y L. BRUNCH (1984). Antibodies reactive with human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* **224**: 506-508.
- SCHONER, R.G.; L.F. ELLIS y B.E. SHONER (1985). Isolation and purification of protein granules from *Escherichia coli* cells overproducing bovine growth hormone. *Biotechnology.* **3**: 151-154.
- SIITARI, H.; P. TURUNEN; J. SCHRIMSHER y M. NUNN (1990). New sensitive and specific assay for HIV antibodies using labeled recombinant fusion protein and time resolved fluoroimmunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **28**(9):2022-2029.
- THORN, R.M.; G.A. BELTZ; C.H. HUNG, A.F. FALLIS; S. WINKLE; K.L. CHEN y D.J. MARCIANI (1987). Enzyme immunoassay using a novel recombinant 25r1 polypeptide to detect human immunodeficiency virus env antibody. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1207-1212.
- TOWBIN, H.; T. STAHELIN y J. GORDON (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *J. Biol. Chem.* **254**: 4350-4354.
- WILSON, M.B. y P.K. NAKANE (1978). Immunofluorescence and related staining techniques. *Elsevier/North Holland Biomedical Press.* Amsterdam: **215**.