

EVALUACION DE UN ELISA BASADO EN LA PROTEINA RECOMBINANTE GP21 PARA EL DIAGNOSTICO DE ANTICUERPOS CONTRA EL HTLV-I.

Daniel Palenzuela,¹ Alina Miranda,¹ Jesús Benítez,¹ Juan Rivero²

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, C.P. 10600 Cuba. ²Sanatorio Santiago de las Vegas, Boyeros, Ciudad de Habana, Cuba

Recibido en noviembre de 1992. Aprobado en junio de 1993.

Key words: HTLV-I/II, ELISA, recombinant antigen, gp21

SUMMARY

An immunoenzymatic assay (ELISA) based on the use of the gp21 recombinant protein of HTLV-I was developed and evaluated. One of the samples from patients with neurological disorders (Tropical Spastic Paraparesis), was found positive in the gp21-ELISA and in the particle agglutination assay (PA) (Fujirebio Inc.). The reactivity of this sample was further confirmed by western blot (WB). Three of the 3384 samples from blood donors, were positive to gp21 ELISA but negative to PA and WB.

One hundred percent of sensitivity was obtained from the study of positive sera panel. Even considering the 3 false positive samples from the blood donors group, the specificity of the gp21 ELISA calculated for the 450 negative samples and 3384 blood donor samples was 99.9%.

RESUMEN

Se desarrolló y evaluó un sistema inmunoenzimático del tipo ELISA basado en el uso de la proteína recombinante gp21 del HTLV-I. Entre las muestras de pacientes con enfermedades neurológicas se detectó un paciente con paraparesia espástica tropical que resultó positivo al ELISA-gp21 y al ensayo de aglutinación de partículas (AP) (Fujirebio Inc.), siendo posteriormente confirmado en western blot (WB). Entre la población de donantes de sangre fueron encontradas 3 muestras que resultaron positivas al ELISA-gp21 y negativas al AP y WB.

La sensibilidad del ELISA-gp21 obtenida a partir del panel de sueros positivos fue de 100%. Aún considerando como negativas las 3 muestras de donantes de sangre, que resultaron positivas al ELISA-gp21, la especificidad del sistema calculada a partir de las 450 muestras negativas y de las 3384 muestra de donantes fue de 99.9%.

INTRODUCCION

El virus humano linfotropo de la célula T (HTLV-I) es un retrovirus del tipo C ARN asociado a la leucemia de células-T del adulto (LTA) y se encuentra relacionado con enfermedades neurológicas como la paraparesia espástica tropical (PET) o mielopatías asociadas al HTLV-I (MAH) (Poiesz *et al.*, 1980; Gessain *et al.*, 1985). La distribución global del HTLV-I se encuentra enmarcada fundamentalmente en dos zonas endémicas,

Japón y la cuenca del Caribe. Se han encontrado también evidencias de la infección en Africa, donde según estudios realizados se supone que exista un reservorio del HTLV-I, además la presencia del virus se ha detectado en algunos países de América Latina, EU y en Europa (Stefan *et al.*, 1991).

En los últimos años se ha incrementado el uso de antígenos del HTLV-I obtenidos por ingeniería genética tanto en la investigación como en el diagnóstico de la infección por este virus. Entre los antígenos recombinantes de mayor interés se encuentra la proteína transmembránica gp21, esto se debe en primer lugar a los altos niveles de sensibilidad y especificidad obtenidos en estudios realizados con esta proteína recombinante (Kenneth *et al.*, 1984) y en segundo lugar a la baja reacción que se observa contra esta proteína en el WB basado en proteínas del lisado viral (Lipka *et al.*, 1991).

Cuba se encuentra en una zona endémica del virus HTLV-I, sin embargo en el estudio realizado por Ramírez *et al.* (1991) entre 1,600 donantes de sangre de varias provincias del país sólo un caso resultó indeterminado por presentar reacción contra la proteína gag19 y entre los 829 pacientes hematológicos analizados se detectó un caso positivo confirmado por WB, por lo que se considera que la isla puede que no sea una zona endémica del virus, aunque se requiere de futuros estudios para confirmar esta hipótesis.

En este trabajo se evaluó el uso en el diagnóstico de anticuerpos contra el HTLV-I, de la proteína recombinante gp21 obtenida en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Entre las poblaciones de suero analizadas contamos con muestras provenientes de donantes de sangre, pacientes con enfermedades hematológicas, neurológicas y con muestras de individuos infectados con el virus HIV-1.

MATERIALES Y METODOS

Muestras

En una primera etapa se utilizó un panel compuesto de 37 sueros positivos al HTLV-I procedentes de varios países (5 de EU, 12 del Japón, 3 de Venezuela, 1 de República Dominicana, 15 de Africa y 1 de Cuba), además se empleó un panel de 450 sueros negativos, previamente analizados con un ensayo de aglutinación de partículas Serodia-Atla (Fujirebio Inc.), para verificar la ausencia de anticuerpos contra el HTLV-I.

Se realizó además un pesquiasaje que abarcó un total de 3,384 muestras provenientes de donantes de sangre. En la categoría de enfermos se incluyen 203 muestras de pacientes con enfermedades hematológicas, 18 muestras de pacientes con enfermedades neurológicas asociadas al HTLV-I y 240 muestras de individuos HIV positivos de Ciudad de la Habana y Pinar del Río (Tabla.1).

Tabla 1
Clasificación de las muestras de suero estudiadas

| CLASIFICACION | N |
|----------------------|-------|
| HTLV-I seropositivos | 37 |
| Donantes de sangre | 3 384 |
| Enfermos | |
| E. Hematológicas | 203 |
| E. Neurológicas | 18 |
| VII Seropositivos | |
| CH | 208 |
| PR | 32 |
| TOTAL | 3 883 |

CH- Ciudad de la Habana. PR- Pinar del Río

Todas las muestras empleadas en este trabajose envasaron en alícuotas de 1 ml y guardadas a -20°C. Las muestras fueron descongeladas no más de 3 veces.

Determinación de anticuerpos

Las muestras de suero se estudiaron mediante el sistema ELISA basado en el uso de la proteína recombinante gp21 del HTLV-I, obtenida en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología con un nivel de pureza superior al 95%.

Para el ensayo inmunoenzimático la proteína gp21 fue fijada a la placa de poliestireno (A/S DK-4000 NUNC, Roskilde Denmark) mediante la incubación por 3 h a 37°C en 100 µl de solución tampón de carbonato de sodio 0.5 M, pH 9.6 a una concentración de 5 µg/ml, posteriormente se lavaron con 200 µl de la solución tampón de lavado (tampón fosfato de sodio (PBS) 1X, 0.05% tween-20).

Las muestras se aplicaron a la dilución 1:21 en 100 µl de la solución tampón (PBS 1X, 0.05% TWEEN-20, 0.02-0.07% de proteínas solubles de *E.coli*) y se incubó durante 30 min a 37°C. Luego de 4 lavados con 200 µl de solución de lavado, se adicionó 100 µl por pocillo del conjugado específico enzima-anticuerpo [antiIgG(h)-peroxidasa] y se incubó a 37°C por espacio de 30 min. Finalmente se lavaron las placas como en el paso anterior y se incubaron con 100 µl del sustrato [tampón citrato fosfato pH 5.5, 0.014% H₂O₂ (BDH Chemical Ltd.), 0.25% OPD (Sigma Chemical Co.)] por 10 min 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 densidad óptica (DO) a 492 nm.

Analisis estadístico

Los 450 sueros negativos se tomaron para poder caracterizar y conocer el comportamiento de la población de sueros no patológicos con el sistema ELISA basado en la proteína recombinante gp21 del HTLV-I.

Primeramente se realizó un test de bondad de ajuste χ^2 al conjunto de valores de DO obtenidos para los sueros negativos, dando como resultado una distribución del tipo log-normal para un 95% de confianza (Chi-cuadrado: p=0.52) (figura 1). Los criterios característicos de la distribución normal (media aritmética y desviación estándar) no se pueden aplicar directamente a la distribución log-normal ya que estos pierden su significado conocido de la distribución gaussiana (Klaus, 1973). En lugar del promedio aritmético y la desviación estándar se determina el promedio geométrico (Xg) y la desviación estándar (logDS) los cuales se calculan a partir de los logaritmos de los datos iniciales,

$$Xg = \text{anti-log } 1/n \sum \log(x_i) \quad \log DS = \sqrt{[(\sum \log^2 x_i - (\sum \log x_i)^2/n)/n-1]}$$

El promedio geométrico obtenido para la distribución de sueros negativos fue de 0.1 y como línea de corte (LC) se acordó tomar el valor definido como:

$$LC = \text{anti-log } (\log Xg + 3 \log DS),$$

el cual para la población de sueros negativos analizados fue de 0.26 y según las características de frecuencias de la distribución normal incluye el 99.7% de los sueros negativos testados.

Las muestras cuyo valor de DO se encuentra por encima de la línea de corte se consideraron fuera del rango normal, es decir patológicas y por tanto positivas al HTLV-I por presentar anticuerpos contra la proteína gp21.

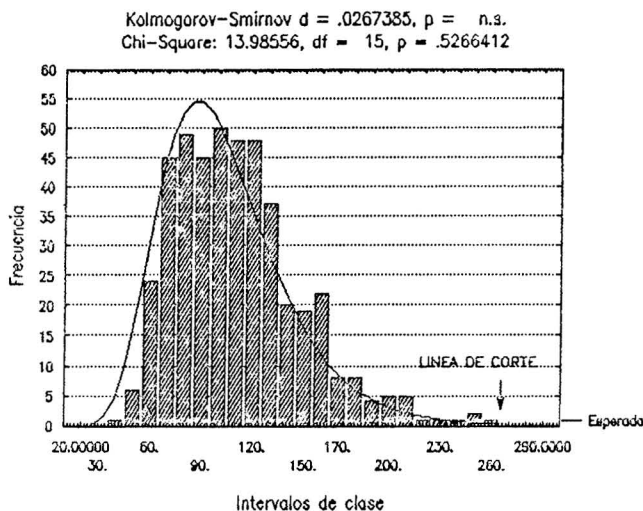


Fig. 1 Distribución log-normal obtenida con la proteína gp21 a partir de los 450 sueros negativos testados.

RESULTADOS Y DISCUSION

El ELISA detectó anticuerpos contra la proteína de la envoltura gp21 en los 37 sueros positivos procedentes de varios países (12 del Japón, 5 de EU, 2 del Caribe, 3 de Venezuela y 15 del Africa). Estos datos le confieren al sistema un 100% de sensibilidad, resultados que coinciden con lo reportado en el trabajo realizado por Trudie (1991).

Las transfusiones de sangre o de componentes celulares de la misma es uno de los mecanismos de trasmisión del HTLV-I (Larson *et al.*, 1988). El estudio realizado por Okochi *et al.* (1984) reporta un alto grado de seroconversión (63.4%) en receptores de sangre y sus componentes celulares, pero no se reporta seroconversión en receptores de plasma de donantes infectados.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un análisis de 3,384 muestras de donantes en coordinación con el Banco de Sangre del municipio Marianao, Ciudad de la Habana. Sólo 3 muestras en reiteradas ocasiones resultaron ser positivas a la proteína recombinante gp21. Dos de los donantes presentaron valores de DO aproximadamente de 0.4 y el tercero de 1.1. Los 3 sueros fueron testados con un ensayo de aglutinación de partículas (AP) (Serodia Atla, Fujirebio Inc.), resultando negativos. También fueron analizadas por WB y no reaccionaron contra ninguna de las bandas correspondientes a las proteínas del virus (figura 2).

El virus HTLV-I, como se ha reportado, se considera el agente etiológico de la leucemia de células-T del adulto (Poiesz *et al.*, 1980). En la literatura encontramos trabajos donde la infección con HTLV-I aparece asociada a enfermedades como la leucemia crónica de linfocitos B, linfoma no Hodgking y otras (Saal *et al.*, 1987, Mann *et al.*, 1987). En este trabajo, analizamos una población de 203 pacientes con enfermedades hematológicas como la leucemia linfocítica aguda y crónica, linfoma Hodgking y no Hodgking, siclemia y otras. Entre las 203 muestras sólo una resultó positiva al ELISA gp21. Esta muestra fue negativa en el ensayo AP y no reaccionó contra ninguna de las proteínas correspondientes al virus representadas en el WB (figura 2).

Otras enfermedades asociadas a HTLV-I son las relacionadas con trastornos neurológicos como la paraparesia espástica tropical (Osame *et al.*, 1986); para la realización de este trabajo se incluyeron 18 muestras del Instituto de Neurología con paraparesia espástica, esclerosis múltiple y otras enfermedades neurológicas. Dos muestras resultaron positivas al ELISA gp21. Una corresponde a un paciente de Ciudad de la Habana con el diagnóstico de aplasia medular y la segunda se trata de un paciente con paraparesia espástica tropical procedente de República Dominicana. Ambas muestras fueron analizadas por los sistemas AP y WB, en el caso del paciente de Ciudad de la Habana este no reaccionó ni con el ensayo AP ni con el WB, mientras que el paciente de República Dominicana resultó positivo al AP y al WB donde reaccionó con las proteínas codificadas por los genes del *gag* y *env* (figura 2).

Se ha reportado que las infecciones con el HTLV-I o el HTLV-II ocurren independientemente de la infección con el HIV (Robert-Guroff *et al.*, 1984). En este estudio se analizaron con el ELISA gp21, 240

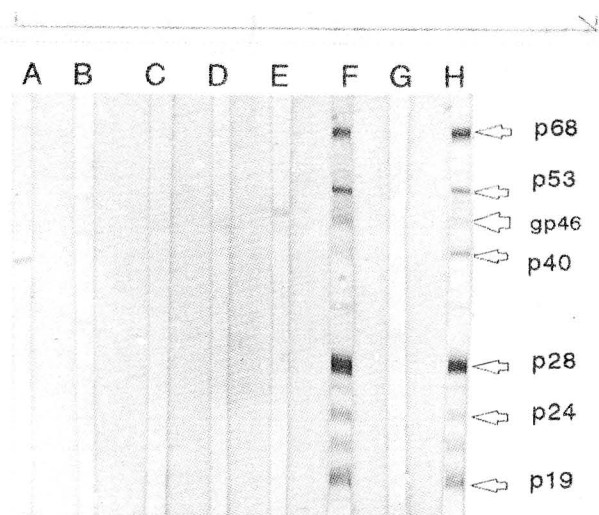


Fig. 2 Western blot con las muestras que resultaron positivas al ELISA gp21. A) Paciente del Inst. de Neurología con aplasia medular. B-D) Donantes de Sangre. E) Paciente del Inst. de Hematología. F) Paciente de República Dominicana con paraparesia espástica tropical

Tabla 2

Scropositividad al HTLV-I en las poblaciones de sueros

| Población | n | ELISA gp21 | AP | WB |
|--------------------|-------|------------|----|----|
| Donantes de sangre | 3,384 | 3 | 0 | 0 |
| E.Hematológicas | 203 | 1 | 0 | 0 |
| E. Neurológicas | 18 | 2 | 1 | 1 |
| VIH seropositivos | 240 | 2 | ND | ND |
| Total | 3,838 | 7 | 1 | 1 |

AP: Test aglutinación de partículas (Fujirebio Inc).WB:Western blot del lisado viral proveniente del Laboratorio Nacional de SIDA. ND: Datos no disponibles

muestras de individuos infectados con el VIH procedentes de Ciudad de la Habana y Pinar del Río, dos pacientes mostraron valores de DO por encima de la línea de corte, no pudiéndose realizar los ensayos AP y WB (Tabla 2).

Las 6 muestras antes mencionadas, que reaccionaron exclusivamente con la proteína gp21 y resultaron negativas en los ensayos AP y WB, pudieran constituir resultados falsos positivos sin embargo, el sistema de aglutinación de partículas AP y el western blot WB, tomados como referencia, emplean proteínas provenientes del lisado viral, donde la proteína gp21 se detecta con dificultad (Lipka *et al.*, 1991). Teniendo en cuenta esto, es posible que estemos en presencia de individuos infectados con el virus HTLV-I por presentar anticuerpos contra la proteína recombinante gp21 exclusivamente. Casos como estos se han reportado en individuos de reciente infección que han reaccionado sólo contra la proteína gp21 (Wiktor *et al.*, 1990).

Para descartar la posibilidad de que estemos ante reacciones inespecíficas con complejos inmunes circulantes o con anticuerpos provocados por la infección de otros retrovirus relacionados con el HTLV-I, todavía no identificados (Gladhill, 1990), es necesario realizar el aislamiento del virus y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como métodos confirmatorios.

No obstante, los resultados obtenidos con el ELISA gp21 (100% de sensibilidad con el panel de sueros positivos y un 99.9% de especificidad, alcanzado en la población de donantes de sangre aún considerando negativas las tres muestras que reaccionaron con la proteína gp21), muestran la utilidad y la importancia de este sistema en el diagnóstico de anticuerpos contra el HTLV-I.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. René Rivero su gentileza en brindarnos las muestras de pacientes con enfermedades hematológicas y a la Dra. Alina González por facilitarnos las muestras de pacientes con enfermedades neurológicas.

REFERENCIAS

- GESSAIN, A.; J.C. VERNANT; L. MAURS; F. BARIN; O. GOUT and A. CALENDER (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* II:407-410.
- GLADHILL, S (1990). Screening blood donors for HTLV-I: the value of epitope mapping of HTLV-I proteins. *Leukemia* 4:723.
- HERNANDEZ, P.R.; R. RIVERO; M.B. SANTOVENIA; L. NAVEA; E. MATUTES; D. CATOVSKY; K. YAMAGUCHI and Y. FUKUYOSHI (1991). Very low seroprevalence of HTLV-I in Cuba: antibodies in blood donors and in hematological and non-hematological patients. *Vox Sanguinis* 61:277-278.
- KENNETH, P.S.; A.L. JAMES; L.J. CHERYL; J. STEVEN; W.S. FLOSSIE and S.P. TAKIS (1984). Diagnostic potential for human malignancies of bacterial and produced HTLV-I envelope protein. *Science* 226: 1094-1096.
- KLAUS, T. (ed) (1973). *Principios de Metodología en Bioquímica Clínica*. Editorial Instituto Cubano del Libro, La Habana, Cuba.
- LARSON, J.C. and H.F. TASWELL (1988). Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) and blood transfusion. *Mayo Clinical Proceedings* 63:869-875.
- LIPKA, J.J.; P. SANTIAGO; L. CHAN; G.R. REYES; K.P. SAMUEL; W.A. BLATTNER; G.M. SHAW; C.V. HANSON; J.J. SNINSKY and S.K.H. FOUNG (1991). Modified western blot assay for confirmation and differentiation of human T-cell lymphotropic virus types I and II. *The Journal of Infectious Diseases* 164:400-403.
- OKOCHI, K.; H. SATO and Y. HINUMA (1984). A retrospective study on transmission of adult T-cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sanguinis* 46:245-253.
- OSAME, M.; K. USUKU; S. IZUMO; N. IJUCHI; H. AMITANI; A. IGATA; M. MATSUMOTO and M. TARA (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*, I:1031-1032.
- MANN, D.I.; P. DeSANIS; G. MARK; A. PFEIFER; M. NEWMAN; N. GIBBS; M. POPOVIC; M.G. SARGADHARAN; R.C. GALLO and J. CLARK (1987). HTLV-I associated B-cell CLL: indirect role for retrovirus in leukemogenesis. *Science* 236:1103.
- POIESZ, B.J.; F.W. RUSCETTI; A.F. GAZDAR; P.A. BUNN; J.D. MINNA and R.C. GALLO (1980). Detection and isolation of type-C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the national Academy of Sciences. USA.* 77:415-7419.
- ROBERT-GUROFF M.; R.A. COUTINHO; A.W. ZADELHOFF; F.A. VYTH-DREESE and P. RUMKE (1984). Prevalence of HTLV-I specific antibodies in surinam emigrants to the Netherlands. *Leukemia Research* 8:501-504.
- SAAL, J.G.; E.M. SCHNEIDER; C. MULLER and H.D. WALLER (1987). HTLV-I related agent and non-Hodgkin lymphomas in a married couple. *Lancet* I:686.
- STEFAN, Z.W. and A. WILLIAM (1991). Epidemiology of human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I). *The Human Retrovirus* 9:175-192.
- TRUDIE, M.H.; E.M. GLEN; F.K. RIMA; B.L. RENU and E.K. JONATHAN (1991). Evaluation of a recombinant human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) p21 antibody detection enzyme immunoassay as a supplementary test in HTLV-I/II antibody testing algorithms. *Journal of Clinical Microbiology* 29:1125-1127.
- WIKTOR, S.Z.; S.S. ALEXANDER; G.M. SHAW; S.H. WEISS; E.L. MURPHY; R.J. WILKS; V.L. SHORTLY; B. HANCHARD and W.A. BLATTNER (1990). Distinguishing between HTLV-I and HTLV-II by western blot. *Lancet* 335:1533.