MEZCLAS DE SUEROS PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS AL VIH MEDIANTE EL SISTEMA DIAGNOSTICO RECVIH 1+2.

Grisel López*, Jesús Benítez** y Rafael Serrano**

* *Centro de Investigaciones Científicas de la D.C. Laboratorio Investigaciones del SIDA. Apartado 23031 Habana 14.** Centro de Ingienería Genética y Biotecnología. Apartado 6162 Habana 6. C.P.10600*

Recibido en julio de 1993. Aprobado en enero de 1994

Key words: RECVIH, pooling, ELISA

SUMMARY

With the aim of decreasing the cost of the assays for antibodies to HIV, the use of pooled samples was studied for the RECVIH 1+2 diagnostic system using two different conjugates: anti-IgG(h) - peroxidase (RECVIH 1+2/IgG) and protein A-peroxidase (RECVIH 1+2/PA). One thousand and eighty blood donor samples, and 224 samples from HIV positive and indeterminate individuals were studied in three approaches: individually and in pools of 5 or 10 samples.

All the positive and indeterminate samples were correctly identified by all the methods. For the 1080 blood donor samples significant differences were found ($p<0.05\%$) between the conjugates in all the approaches, being the results obtained for the RECVIH 1+2/PA higher than those obtained for the RECVIH 1+2/IgG.

It was concluded that for the version RECVIH 1+2/IgG, it is not feasible to use pooled samples due to the high number of false positive results. However, with the use of the RECVIH 1+2/PA system, the implementation of this approach reduces in about 4 times the cost of the test for the detection of antibodies to HIV in low prevalence populations.

RESUMEN

Con el objetivo de reducir los costos de las pruebas para la detección del VIH, se estudió la posibilidad de emplear mezclas de sueros utilizando el sistema diagnóstico RECVIH 1+2, mediante el uso de dos conjugados enzimáticos: anti-IgG(h) - peroxidasa (RECVIH 1+2/IgG) y proteína A-peroxidasa (RECVIH 1+2/PA). Para ello se estudiaron 1080 muestras de donantes de Banco de Sangre y 224 de personas positivas e indeterminadas al VIH en tres variantes: individualmente y en mezclas de 5 y 10 unidades.

Las 224 muestras de positivos e indeterminados se detectaron correctamente en las tres variantes y se observó que no existen diferencias significativas entre el RECVIH 1+2/IgG y el RECVIH 1+2/PA. El estudio de los 1080 sueros de donantes arrojó diferencias significativas ($p<0.05\%$) entre los dos conjugados enzimáticos para cada una de las variantes ensayadas, obteniéndose para el sistema RECVIH 1+2/PA resultados superiores a los obtenidos para el RECVIH 1+2/IgG.

Se concluyó que con el sistema diagnóstico RECVIH 1+2/IgG no es factible la utilización de mezclas de sueros debido al elevado número de resultados falsos positivos, sin embargo empleando el sistema diagnóstico RECVIH 1+2/PA el uso de mezclas de sueros reduce, aproximadamente 4 veces los costos de las pruebas de detección de anticuerpos al VIH, en estudios realizados en poblaciones de baja prevalencia.

INTRODUCCION

Con el incremento de las personas infectadas por el VIH (agente causal del SIDA), en el mundo se han desarrollado diversos programas de vigilancia y control, se ha generalizado el análisis del 100% de los suministros de sangre y la realización de estudios epidemiológicos, lo cual hace estos programas considerablemente costosos y por tanto inaccesibles para muchos países (Anónimo, 1991; Constantine *et al.*, 1991).

En los últimos años se ha estudiado la posibilidad de reducir estos costos utilizando mezclas de 3, 5, 10, 15, 20 y hasta de 25 sueros (Quinn *et al.*, 1988; Emmanuel *et al.*, 1988; Cahoon-Young *et al.*, 1989; Kline *et al.*, 1989; Behets *et al*, 1990; Frösner *et al.*, 1990; Patrascu 1990; Constantine *et al*, 1991, Monzon *et al.*, 1991; Seymour *et al.*, 1992.), siendo generalmente recomendada la utilización de mezclas de 3 a 10 sueros para el método de ELISA. Este procedimiento se ha reportado como especialmente útil en áreas donde la seroprevalencia de infección por VIH sea menor del 2% (Anónimo, 1991); es además muy importante que sólo se requieran cambios mínimos en los procedimientos de ensayo recomendados por el fabricante y que la sensibilidad y la especificidad del sistema empleado no se vean afectadas.

En este trabajo nos propusimos estimar la efectividad de las mezclas de sueros para realizar estudios poblacionales a gran escala, utilizando el sistema RECVIH 1+2, desarrollado por el Centro de Ingienería Genética y Biotecnología de Ciudad de la Habana (CIGB).

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

MATERIALES Y METODOS

Muestras

Se estudiaron 1080 muestras de sueros tomadas a donantes del Banco de Sangre de Marianao, negativas al ensayo para determinar anticuerpos al VIH-1 y VIH-2 (UMELISA HIV- Recombinant New, CIE).

Las muestras se colectaron en el transcurso de dos semanas y se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso, incluyendo dos ciclos de congelación descongelación como máximo. Por otra parte, se estudiaron 224 muestras del banco de referencia del laboratorio de investigaciones del SIDA (LISIDA), con resultados positivos en las pruebas de ELISA y confirmadas como positivas al VIH-1 (205), positivas al VIH-2 (3) e indeterminadas al VIH-1 (16), mediante la técnica western blot (WB,) utilizando los estuches: western blot IgG assay (Diagnostic Biotechology), DAVIH blot (Laboratorios DAVIH) y New Lav Blot (Diagnostic Pasteur).

Ensayos

Se utilizó el sistema diagnóstico, RECVIH 1+2 (CIGB) que es un ELISA de tipo indirecto con antígenos recombinantes del VIH-1 (p24, gp41, gp120) y VIH-2 (gp36) (Benítez et al., 1992). Se emplearon dos sistemas de revelado, el tradicional que emplea un conjugado de anti-IgG(h)-peroxidasa (RECVIH 1+2/IgG) y otro que emplea un conjugado de proteína A-peroxidasa (RECVIH 1+2/PA).

Métodos

Tanto las 1080 muestras de donantes como las 224 del banco de referencia del LISIDA fueron estudiadas individualmente y en mezclas de 5 y de 10 sueros. Las muestras de donantes fueron agrupadas consecutivamente en mezclas de 5 y 10, mientras que las positivas e indeterminadas fueron diluídas con 4 ó 9 sueros de donantes sanos. Las mezclas de sueros de donantes que resultaron positivas fueron estudiadas individualmente. Las muestras individuales que resultaron repetidamente positivas se analizaron mediante Vironostika HIV Technika-MIXT (Organon Teknika) y fueron confirmadas por DAVIH blot (DAVIH Laboratorios).

Con el objetivo de mantener la dilución de cada muestra individual en el volumen de reacción, se analizaron 5 μl en el caso de las muestras individuales, 25 μl en el caso de las mezclas de 5, y 50 μl para las mezclas de 10 sueros para completar un volumen de 100 μl con el diluente de muestra del estuche, de esta forma la dilución final de cada muestra fue de 1:20.

Debido a que está recomendado el uso de este método en poblaciones con seroprevalencias tan altas como 2% y en la población estudiada ésta es mucho menor (0.006%), se estudió además una población con prevalencia simulada de 1.66%, utilizando 18 sueros positivos conocidos y 1062 sueros de donantes de sangre, siguiéndose la misma metodología.

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de t de Student para datos pareados. Los datos obtenidos en diferentes corridas fueron homogeneizados previamente. En lugar de emplear el valor de absorbancia (Abs), en los cálculos, se empleó la relación (R), definida como el cociente del valor de absorbancia obtenido para cada muestra y el valor límite (VL) calculado para la correspondiente corrida (R = Abs/VL), de este modo los valores de $R > 1$ corresponden a resultados positivos y los $R < 1$ a resultados negativos.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los 1080 sueros de donantes de Banco de Sangre, 6 resultaron repetidamente positivos por RECVIH 1+2/IgG, y 1 por RECVIH 1+2/PA, pero fueron negativos por Vironostika HIV MIXT y DAVIH blot (tabla 1).

Tabla 1

Resultados de los 1080 sueros de donantes de sangre, estudiados individualmente y en mezclas de 5 sueros y 10 sueros.

	RECVIH 1+2 (IgG)			RECVIH 1+2 (PA)		
	Muestras Indiv.	Mezclas de 5	Mezclas de 10	Muestras Indiv.	Mezclas de 5	Mezclas de 10
No. muestras	1080	216	108	1080	216	108
P1	14	33	98	5	4	4
FP (%)	1.3	15.3	90.7	0.46	1.8	3.7
P2	6	6*	6*	1	0	0
FP (%)	0.55	0.55	0.55	0.09	0	0
Especificidad (%)	99.44	99.44	99.44	99.90	100	100

P1- positivos en el primer análisis, FP- falsos positivos, P2- repetidamente positivos, *- se refiere a muestras individuales.

Aunque la especificidad (teniendo en cuenta los resultados finales para las muestras individuales) en cada sistema fue similar cuando se estudiaron las muestras individualmente, o en mezclas de 5 y 10 sueros, es evidente que al realizar las mezclas aumentan los resultados falsos positivos. Para el sistema RECVIH 1+2/IgG el 15.27% de las mezclas de 5 sueros y el 90.74% de las mezclas de 10 sueros resultaron positivas, mientras que para el RECVIH 1+2/PA solo fueron positivas el 1.85% de las mezclas de 5 sueros y el 3.7% de las mezclas de 10 sueros (tabla 1), se observó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos sistemas, tanto para las muestras individuales como para las mezclas de 5 y 10 sueros.

En la figura 1 se observa un discreto desplazamiento de los valores centrales de R cuando se utilizó el conjugado de PA, sin embargo al utilizar el conjugado de anti-IgG se aprecia un marcado desplazamiento de estos valores, principalmente en las mezclas de 10 sueros, donde la R alcanzó generalmente valores mayores de la unidad.

Las 224 muestras de personas positivas e indeterminadas al VIH-1 y VIH-2 pertenecientes al banco de referencia del LISIDA, fueron correctamente clasificadas por los dos sistemas al ser estudiadas individualmente y en mezclas de 5 y 10 sueros, se observó que con la dilución (mezclas de 5 y 10 sueros) ocurre un ligero desplazamiento de los valores centrales de R hacia uno (figura 2), sin llegar a obtenerse resultados falsos negativos, por lo que se alcanzó una sensibilidad de 100% en todos los casos y no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05\%$) entre los dos sistemas, para ninguna de las variantes.

Los 18 sueros positivos al VIH distribuidos en los 1062 sueros negativos fueron detectados correctamente por los sistemas ELISA RECVIH 1+2/IgG y RECVIH 1+2/PA

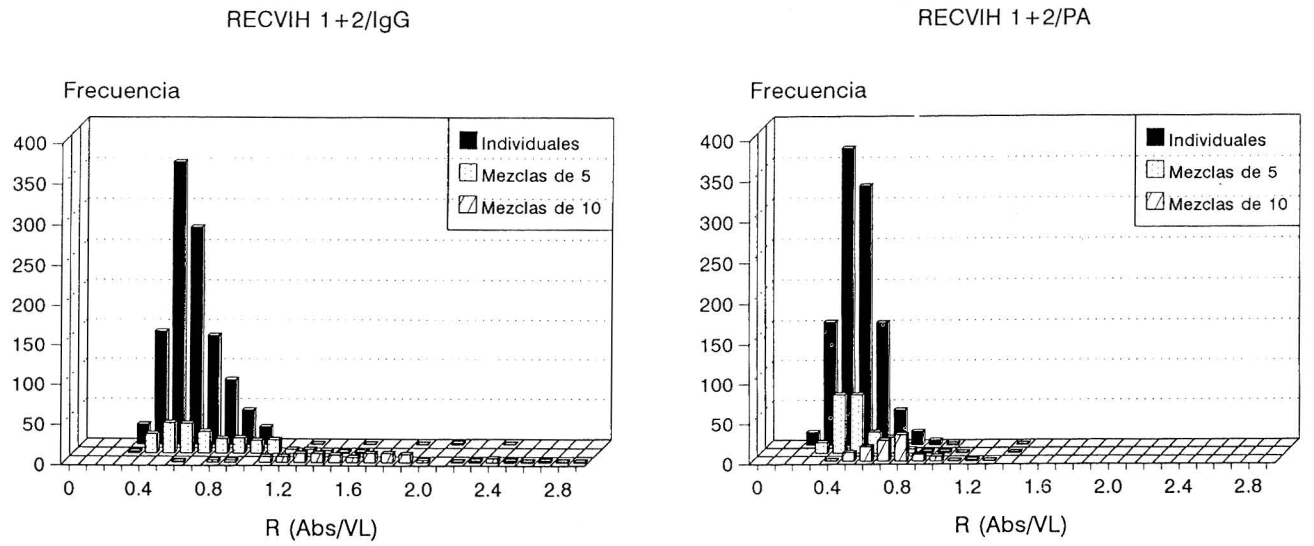

Fig. 1. Histogramas de las 1080 muestras de donantes de sangre.

en ambas mezclas (5 y 10 sueros), alcanzándose un 100% de sensibilidad para todas las variantes y una especificidad de 99.44 y 100% para el RECVIH 1+2/IgG y RECVIH 1+2/PA, respectivamente (tabla 2).

La aparición de casos falsos positivos que resultó proporcional al incremento de volumen total de suero añadido, podría disminuirse al aumentar el volumen de reacción a 150 ó 200 μL, compensando en parte la disminución en el factor de dilución. En el caso del sistema RECVIH 1+2/PA el número de mezclas positivas (1.85% de las mezclas de 5 sueros y 3.7% de las mezclas de 10 sueros) podría aún disminuirse de esta forma, pero esto conllevaría a un cambio en el protocolo del sistema.

El uso de dos conjugados diferentes en el mismo sistema dió diferencias significativas en cuanto a especificidad (tablas 1 y 2). El empleo del conjugado de PA repercutió en un incremento de la especificidad del sistema. Esto es válido también en el caso de analizar muestras individuales, pero más aún en el caso de realizar la mezclas de sueros, debido a que este proceder es dado a incrementar ligeramente los valores de absorbancia obtenidos para los sueros negativos. En el ensayo estudiado el incremento de los valores de absorbancia al emplearse el conjugado de anti-IgG pudiera deberse,

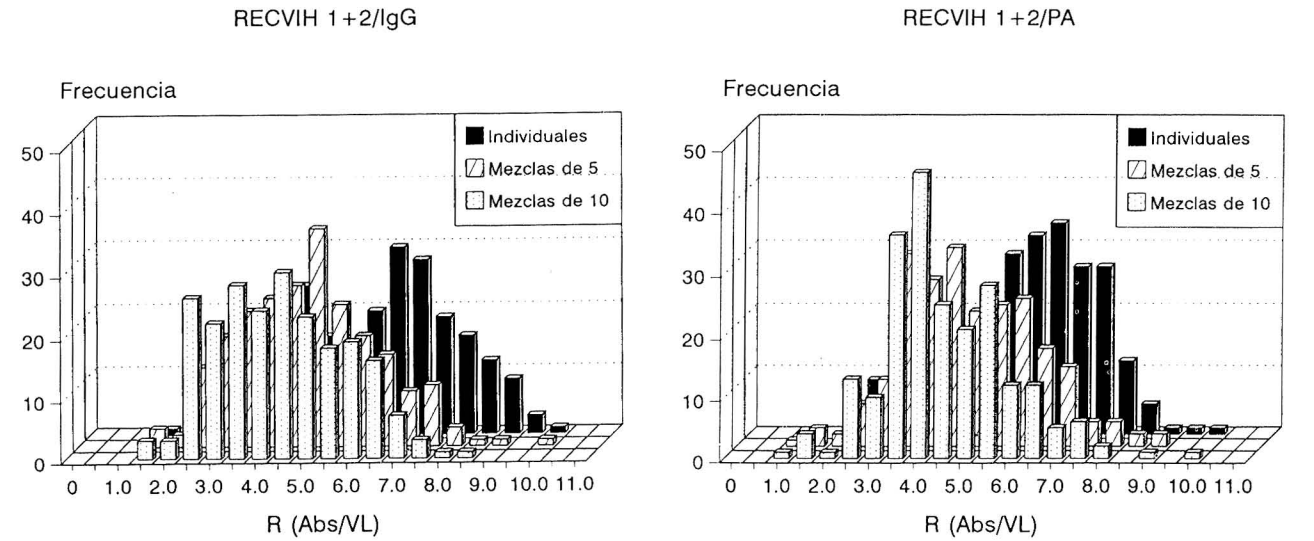

Fig 2. Histogramas de las 224 muestras de individuos seropositivos e indeterminados al VIH.

Tabla 2
Resultados de las mezclas de 1080 sueros que contienen 18 seropositivos al VIH.

	RECVIH 1+2 (IgG)		RECVIH 1+2 (PA)	
	Mezclas de 5	Mezclas de 10	Mezclas de 5	Mezclas de 10
No. de muestras	216	108	216	108
P1	52	94	24	23
P2	24*	24*	18*	18*
VP	18*	18*	18*	18*
FP (%)	0.55	0.55	0	0
FN (%)	0	0	0	0
Sensibilidad (%)	100	100	100	100
Especificidad (%)	99.44	99.44	100	100

P1- positivos en el primer análisis, FP- falsos positivos, VP- verdaderos positivos, FN- falsos negativos, P2- repetidamente positivos, *- se refiere a muestras individuales.

entre otras causas, a la presencia de anticuerpos de carnero contra proteínas del sistema hospedero *(E. coli)* en la preparación de inmunoglobulinas que, al ser posteriormente conjugados con peroxidasa, son capaces de reconocer las proteínas contaminantes de *E. coli* fijadas a la superficie sólida. Esto da como resultados valores de absorbancia superiores a los obtenidos con el conjugado de PA (en prensa).

Con el sistema RECVIH 1+2/IgG no es factible la utilización de mezclas de sueros debido al elevado número de falsos positivos, sin embargo empleando el sistema diagnóstico RECVIH 1+2/PA, el uso de mezclas de sueros es un método efectivo, especialmente cuando éstas se componen de 5 sueros, lo que coincide con los resultados de Emmanuel *et al.* (1988), Patrascu (1990) y Monzon *et al.* (1991).

Se concluyó que las mezclas de 5 sueros empleando el sistema diagnóstico RECVIH/PA reduce aproximadamente 4 veces los costos de las pruebas de detección de anticuerpos al VIH, en estudios realizados en poblaciones de baja prevalencia.

REFERENCIAS

ANONIMO (1991). Recomendaciones para el testaje de anticuerpos del VIH en mezclas de sueros. Document 2. WHO.

BEHETS, F.; S. BERTIZZI; M. KASALI; M. KASHAMUKA; L. ATIKALA; C. BROWN; R.W. RYDERR and T.C. QUINN (1990). Successful use of pooled sera to determine HIV-1 seroprevalence in Zaire with development of cost-efficiency models. AIDS **4**:737-741.

BENITEZ, J.; V. LEAL y L. NOVOA (1992) Estudio de la especificidad del sistema RECVIH para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 y VIH-2. Biotecnología Aplicada **9(1)**:66-69.

CAHOON-YOUNG, B.; A. CHANDLER; T. LIVERMORE; J. GAUDINO; R. BENJAMIN (1989). Sensitivity and specificity of pooled versus individual sera in human inmunodeficiency virus antibody prevalence study. Journal of Clinical Microbiology **27(8)**:1893-1895.

CONSTANTINE, N.T.; J.D. CALLAHAN y D.N. WATTS (1991). Técnicas de laboratorios en: Pruebas para la detección del VIH y control de la calidad. Guía para el personal de laboratorio. Eds. S. Mitchell and R. Gringle. Family Healht International. Carolina del Norte. 148-149.

EMMANUEL, J.C.; M.T. BASSETT; H.J. SMITH; J.A. JACOBS (1988). Pooling of sera for human inmunodeficiency virus (HIV) testing an economical methods for use in develoing countries. Journal of Clinical Pathology **41(5)**:582-585.

FRÖSNER, G.G.; G. DOBLER and F.J. FALKNER VON SONNERNBURG (1990). Cost reduction of unlinked testing for anti-HIV investigation of pooled sera. AIDS **4**:73-75.

KLINE, R.L.; T.A. BROTHERS; R. BROOKMEYER; S. ZEGER; T.C. QUINN (1989). Evaluation of human inmunodeficiency virus seroprevalencia in population surverys using pooled sera. Journal of Clinical Microbiology. **27(7)**:1449-1452.

MONZON, O.T.; F.J.E. PALADIN; E. DIMAANDAL, A.M. BALIS; C. SAMSON and S. MITCHELL (1992). Revelance of antibodycontent and test format in HIV testing of pooled sera. AIDS **6**:43-48.

PATRASCU, I.V. (1990). Evaluation of efficacy of pooled serain a human inmunodeficiency virus antibody prevalence in population surveys. Rev. Roum. Virol. **41(1)**:45-51.

QUINN, T.; R. KLINE; T. BROTHERS; S. ZERGER; R. VISCIDI; R. BROOKMEYER (1988). Efficient evaluation of human immunodeficiency virus (HIV) seroprevalence in population surveys using pooled sera. IV International Conference on AIDS. Stockholm. (Abstract 5602).

SEYMOUR, E. (1992). Use of both pooled saliva and pooled serum sample for the determination of HIV-1/HIV-2 antibodies by both conventional and Rapid EIA Techniques. In: Eighth Annual International AIDS Conference, The Netherlands.