

Estudio comparativo de dos sistemas de captura de la proteína de 24 kD del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

✉ Maricela Izquierdo,¹ Eladio Silva,¹ Héctor Díaz,² Ana L Lubián,² Carmen Nibot,¹ Dolores Tabares¹

¹Departamento de Inmunotecnología. ²Departamento de Inmunología. Laboratorio de Investigaciones del SIDA. AP 23031, La Habana, Cuba. Telf.: (53-7) 57 4009; Fax: (53-7) 57 4152; E-mail: cicdc@infomed.sld.cu

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo entre los sistemas HIV-1 P24 Antigen ELISA Test (Coulter, EUA) y DAVIH-Ag P24 (Laboratorios DAVIH, Cuba) para la detección del antígeno P24 del VIH-1. Mediante ambos sistemas se estudiaron en paralelo 1 039 muestras de suero de donantes de sangre y 323 de individuos seropositivos en diferentes estadios de infección por VIH-1. La presencia de antígeno se relacionó con el grupo clínico y los niveles de anticuerpos contra la P24. Los resultados mostraron que ambos diagnosticadores son altamente específicos (más de 99%), con una concordancia de 99,7%. Para la población positiva estudiada, el sistema DAVIH-Ag P24 resultó más sensible que el sistema de la firma Coulter. Los por cientos de antigenemia fueron mayores en el grupo de los pacientes de SIDA. Los títulos de anticuerpos contra la P24 resultaron ser bajos o no reactivos en todos los sueros con antigenemia a esta proteína. Se concluyó que el sistema DAVIH-Ag P24 puede ser utilizado para el seguimiento de personas infectadas con el VIH-1 como marcador pronóstico de la infección, y para el pesquisaje de la P24 en los bancos de sangre.

Palabras claves: antigenemia, ELISA, marcadores de progresión, P24, seroconversión, VIH-1

Biotecnología Aplicada 2000;17:102-104

ABSTRACT

Comparative Study of Two Capture Systems for the 24-kD protein of Human Immunodeficiency Virus.

A comparative study between HIV-1 Antigen ELISA Test (Coulter, USA) and DAVIH-Ag P24 (DAVIH Laboratories, Cuba) was performed for the detection of HIV-1 P24 antigen. A total of 1039 serum samples of blood donors' sera were studied, in addition to 323 sera from seropositive individuals in different stages of the disease. The presence of antigen was associated with the clinical group and the levels of antibodies against P24. Both systems showed a high specificity (greater than 99%) with a concordance of 99.7%. DAVIH-Ag P24 system showed a sensitivity (58/31) greater than Coulter system when it was tested in the positive population. Percents of antigenemia were greater in the AIDS group. Antibody titers against P24 were low or absent in all the sera with antigenemia to this protein. It was concluded that DAVIH-Ag P24 system can be used in the follow-up of HIV-1 infected individuals as a progression marker of the infection, and to screen P24 in blood banks.

Keywords: antigenemia, ELISA, HIV-1, P24, progression markers, seroconversion

Introducción

El SIDA es la pandemia más importante de nuestro siglo por su crecimiento exponencial; las consecuencias familiares, sociales o laborales; y su desenlace mortal en todos los casos. En estos momentos constituye una amenaza para los programas internacionales de seguridad de la sangre, por lo que la política de algunos países en este sentido está encaminada a la detección de la infección en etapas tempranas [1]. La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tiene un perfil serológico característico que permite detectar dos etapas de antigenemia: una al inicio de la infección y antes de la seroconversión, a la que se le ha llamado "período de ventana", y otra que aparece cuando se establece el compromiso inmunológico y la evolución a SIDA es irreversible.

Hasta la fecha, el diagnóstico se realiza mediante pesquisaje serológico de anticuerpos y mediante ensayos complementarios de confirmación como Western blot [2]. A pesar de que ha aumentado notablemente la sensibilidad de los ensayos basados en anticuerpos, aún existe el riesgo de infección a través de la sangre durante el período de ventana. Por este motivo, cada día cobra mayor importancia la introducción de ensa-

yos para la detección del antígeno P24 (Ag P24) o de ácidos nucleicos virales [3].

En 1994, expertos de la Food and Drug Administration (FDA) determinaron que aunque las técnicas genéticas eran capaces de detectar el VIH antes de la seroconversión, no era factible su utilización en el pesquisaje masivo. Como alternativa, se valoró la prueba de detección de antígeno para reducir el bajo riesgo de transmisión del VIH a través de las transfusiones de sangre y los productos hemoderivados, y para facilitar la incorporación de este ensayo en el pesquisaje de los donantes. Después de varios años de investigación, el 14 de marzo de 1996 se aprobó la utilización de esta prueba en los bancos de sangre de los Estados Unidos [4].

La concentración en sangre de la proteína P24 del VIH-1 varía notablemente en el curso de la infección, por lo que también se utiliza como marcador serológico en los estudios de terapia antiviral y en el diagnóstico de la infección en el período perinatal de niños nacidos de madres seropositivas [5, 6].

El sistema ELISA DAVIH-Ag P24 (Laboratorios DAVIH, Cuba) permite la detección del Ag P24 del

1. Courouce AM, Barin F, Maniez M, Janot C, Noel L, Elghouzzi MH. Effectiveness of assays for antibodies to HIV and P24 antigen to detect very recent HIV infections in blood donors. *AIDS* 1992;6(12):1548-50.

2. Cruz O, Pérez MT, Izquierdo M, Lobaina L, Ruibal I, Silva E. Evaluación de un sistema de Western blot (DAVIH-Blot) para la confirmación de anticuerpos al VIH-1. *Rev Cubana Med Trop* 1997;49(1):28-31.

3. Bush Mp, Lee LLL, Salten GA, Henrard DR, Farzadegan H, Nelson KE, et al. Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors. *Transfusion* 1995;35(2):91-7.

4. Ortho Diagnostic Systems Inc. and Chiron Corporation. FDA Licenses First HIV Antigen Assay for Blood Screening. *Transfusion Diagnostics Update*. March 1996: 1 and 8.

5. Papavangelou V, Pollack H, Rigaud M, Arlievsky N, Lu ML, Rochford G, et al. The amount of early P24 antigenemia and not the time of first detection of virus predicts the clinical outcome of infants vertically infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1996;173:574-8.

VIH-1 y puede ser utilizado para el monitoreo de cultivos de aislamientos [7], como marcador pronóstico de la infección en el seguimiento de pacientes seropositivos y en los programas de vigilancia de las muestras de los bancos de sangre [8].

El presente trabajo compara el sistema DAVIH-Ag P24 con el sistema HIV-1 P24 Antigen ELISA Test (Coulter, EUA) aprobado por la FDA para el pesquiasaje de la proteína P24 en muestras de suero o plasma en los bancos de sangre.

Materiales y Métodos

Muestras

Se colectaron 1 039 muestras de suero de donantes de sangre en el banco provincial de Ciudad de La Habana, Cuba y 323 muestras de suero de personas infectadas por VIH con diagnóstico confirmado por Western blot y otras pruebas complementarias. Las muestras se agruparon según la clasificación del Centro para el Control de Enfermedades en: 44 muestras de SIDA, 60 del grupo IV no SIDA, 18 del grupo III y 201 del grupo II.

Ensayos

Antigen ELISA Test System (Coulter, USA). Es un ensayo inmunoenzimático de tipo sandwich que utiliza anticuerpos monoclonales en la fase sólida y anticuerpos policlonales anti-VIH-1 marcados con biotina. El tiempo que se empleó en el ensayo fue de 3,5 h aproximadamente.

DAVIH-Ag P24 (Laboratorios DAVIH, Cuba). Es un ensayo inmunoenzimático de tipo sandwich que utiliza anticuerpos monoclonales como sistema de captura y anticuerpos policlonales específicos contra la proteína P24 del VIH-1 conjugados a peroxidasa. El ensayo dura de 20 a 22 h aproximadamente. Se siguieron estrictamente las instrucciones de los fabricantes.

Todas las muestras se analizaron en paralelo por ambos sistemas antes de las 24 h de colectadas. Las muestras reactivas repetidamente se estudiaron con los reactivos neutralizantes asociados a cada diagnóstico para finalmente clasificarlas como positivas, negativas o indeterminadas.

Se estudió la especificidad de ambos diagnosticadores (verdaderos negativos/verdaderos negativos + falsos positivos), y la prevalencia de Ag P24 en cada grupo clínico. Se calculó la concordancia (número de positivos por ambos sistemas + número de negativos por ambos sistemas/número total de muestras estudiadas) y la relación entre la presencia de antigenemia a la P24 y el título de anticuerpos contra esta proteína mediante el empleo del sistema microELISA DAVIH-Ac P24 (Laboratorios DAVIH, Cuba).

Para comparar la frecuencia de positividad obtenida por ambos métodos, se realizó la prueba de chi cuadrado.

Resultados y Discusión

Como se observa en la Tabla 1, la especificidad del sistema DAVIH-Ag P24 es elevada y similar a la del sistema HIV-1 P24 Antigen ELISA Test utilizado en este estudio como sistema de referencia, por estar aprobado por la FDA [4] para el pesquiasaje en bancos de sangre. La concordancia entre los diagnosticadores

Tabla 1. Estudio de especificidad en muestras de donantes de sangre.

	DAVIH-Ag P24 (99,8%)				
	n = 1 039	Post	Indt	Negt	Total
HIV-1 P24 Antigen ELISA Test (99,9%)	Post	0	0	0	0
	Indt	0	0	1	1
	Negt	0	2	1 036	1 038
	Total	0	2	1 037	1 039

Fuente: Laboratorios DAVIH, Cuba. Post, positivo; Indt, indeterminado; Negt, negativo. Concordancia: 99,7%.

fue mayor de 99%. En los estudios de pesquiasaje de este marcador viral, es importante obtener resultados de especificidad similares a los encontrados en este trabajo, debido a que la prevalencia de la infección por VIH en donantes de sangre es generalmente baja. De lo contrario, se desecharía un número grande de unidades de sangre sin tener en cuenta la repercusión social de los falsos positivos.

Estudios reportados en la literatura señalan que con la incorporación de la prueba de detección de Ag P24 en todas las unidades de sangre y plasma, disminuye el riesgo de transmisión del VIH por transfusiones debido a que es posible detectar la infección durante el período de ventana, 6 días antes de la aparición de anticuerpos [3]. La prevalencia de la infección en la población donante y la duración del período de ventana inciden en el riesgo de transmisión, por lo que en los Estados Unidos se espera reducir 25% las infecciones no detectables mediante el empleo de los sistemas de anticuerpos. Esto representa un valor estimado de 18 a 27 donaciones por año [8]. Desde 1986 hasta la fecha, la prevalencia en Cuba de seropositividad acumulada de anticuerpos antiVIH en donantes de sangre es de 0,002%. De este valor se puede inferir que el índice de antigenemia que se esperaría es prácticamente nulo, por lo que no ha sido necesario incorporar el pesquiasaje de este marcador viral en los bancos de sangre del país.

Mediante el sistema DAVIH-Ag P24 se detectó un número mayor de muestras positivas que con el uso del sistema HIV-1 P24 Antigen ELISA Test (58/31). El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre ambos diagnosticadores para $p < 10^{-7}$. Como se observa en la Tabla 2, todas las muestras que resultaron indeterminadas con el estuche de la firma Coulter fueron clasificadas como positivas por DAVIH-Ag P24, mientras que las indeterminadas por este último ensayo resultaron negativas por HIV-1 P24 Antigen. Estos resultados indican que el sistema producido en Cuba fue más sensible para la población positiva estudiada.

Si se toman en cuenta las características descritas para cada uno de los ensayos, la mayor sensibilidad

Tabla 2. Comparación entre los estuches HIV-1 P24 Antigen ELISA Test y DAVIH-Ag P24 frente a muestras de individuos seropositivos.

	DAVIH-Ag P24				
	n = 323	Post	Indt	Negt	Total
HIV-1 P24 Antigen ELISA Test	Post	30	0	1	31
	Indt	7	0	0	7
	Negt	21	7	257	285
	Total	58	7	258	323

Fuente: Laboratorios DAVIH, Cuba. Post, positivo; Indt, indeterminado; Negt, negativo. Concordancia: 88,8%.

6. Arlievsky NZ, Pollack H, Rigaurd M, Raul A, Krasinski K, Bolkowsky W. Shortened survival in infants vertically infected with human immunodeficiency virus with elevated P24 antigenemia. *J Pediatr* 1995;127(4):538-43.

7. Lobaina L, Noa E, Dubed M, Navea L, Vilarrubia OL, Diaz H. Isolation and virological characterization of HIV-1 in Cuba. Relationship with the clinical status of the patients. *Biomed Pharmacother* 1996;50:501-4.

8. CDC. US Public Health Service guidelines for testing and counseling blood and plasma donors for human immunodeficiency virus type 1 antigen. *MMWR* 1996; 45(RR-2):1-9.

que se observó con el sistema DAVIH-Ag P24 pudiera deberse a la utilización de un conjugado específico contra la proteína P24, mientras que en el sistema HIV-1 P24 Antigen ELISA test el conjugado reconoce todas las proteínas del VIH-1. Otra explicación se basa en el tiempo de captura de la P24: mientras el estuche de Coulter lo hace sólo en 1 h, el sistema cubano demora de 18 a 20 h.

La mayor frecuencia de antigenemia observada en el grupo clasificado como SIDA por ambos diagnósticos, coincide con lo que se ha reportado en la literatura, que señala una prevalencia entre 30% y 50% para este grupo. En este grupo, la presencia de Ag P24 se asocia directamente con la evolución a etapas más graves de la enfermedad o a estadios finales donde la carga viral aumenta notablemente y disminuyen los títulos de anticuerpos contra la P24. En el grupo II se clasificaron los individuos asintomáticos infectados con el VIH, la frecuencia de antigenemia observada está relacionada con el período de seroconversión, y se plantea que es menor de 20%, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla 3) [9-14].

En los estudios de la infección por VIH se han utilizado múltiples marcadores de progresión, ya que el período de latencia clínica que tiene lugar antes de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad no se corresponde con un período de latencia virológica, según lo corroboran las investigaciones realizadas por otros autores. En estos estudios, la carga viral detectable en suero o plasma es mínima en el estadio asintomático, mientras que en el tejido linfático el VIH se replica intensamente hasta 10 veces más que en el tejido periférico [15, 16]. Esta observación constituye un sustento sólido para defender el inicio temprano de la terapia antiviral durante el período asintomático, y refuerza la necesidad de contar con marcadores de progresión de la enfermedad y para el monitoreo de la terapéutica antirretroviral en todos los estadios de la infección. Entre los marcadores estudiados se en-

Tabla 3. Antigenemia a la P24 por grupo clínico.

Grupo clínico	n	HIV-1 P24 Antigen ELISA Test		DAVIH-Ag P24	
		No.	(%)	No.	(%)
SIDA	44	9	(20,45)	15	(34,09)
IV no SIDA	60	7	(11,66)	12	(20)
III	18	0	-	1	(5,5)
II	201	15	(7,4)	30	(14,9)
Total	323	31	(9,6)	58	(18)

Fuente: Laboratorios DAVIH, Cuba.

cuentran el conteo de linfocitos CD4+ [16], el número absoluto de linfocitos CD8+ [18], la β_2 -microglobulina y la neopterinina [17, 19], el nivel sérico de inmunoglobulina A, la detección de los niveles de anticuerpos contra la P24 [20], y la presencia de esta proteína en el suero de los individuos infectados. La determinación de la carga viral es el más poderoso de los ensayos utilizados con estos fines [21]. Hasta la fecha, no se ha descrito ningún marcador ideal de progresión y se plantea que su uso combinado aumenta el valor predictivo o pronóstico [10, 17].

En este trabajo, los resultados del estudio serológico paralelo entre los sistemas de captura de antígeno HIV-1 P24 Antigen ELISA Test y DAVIH-Ag P24, y DAVIH- Ac P24, corroboran lo descrito para estos marcadores. Se puede apreciar cómo ambos marcadores se comportan inversamente proporcionales [17, 19, 22-24]. Siempre que se detectó antigenemia, los sueros no mostraron títulos de anticuerpos contra la P24 o fueron menores que 1/250, valores que el fabricante considera bajos [19].

En la actualidad, el estuche DAVIH-Ag P24 es utilizado con buenos resultados en el seguimiento de personas infectadas por el VIH y en investigaciones relacionadas con la infección por VIH/SIDA. Además, por los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda su empleo en los programas de sangre segura de los bancos de Cuba si es necesario y se decide su introducción.

16. Coffin JM. Population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science* 1995; 267:483-9.

17. Fahey JL, Taylor JMG, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P. The prognostic value of cellular and serological markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1990;32:166-72.

18. Phillips AN, Sabin CA, Elfors J, Boffill M, Lee CA, Janossy G. CD8 lymphocyte counts and serum immunoglobulin A levels early in HIV infection as predictors of CD4 lymphocyte depletion during 8 years follow-up. *AIDS* 1993;7:975-80.

19. Sheppard HW, Ascher MS, Mc Rae B,

Anderson RE, Lang W, Allain JP. The initial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease. *J Acquir Immun Syndr* 1991;4:704-12.

20. Díaz H, Silva E, Rodríguez O, Bárcena J, Lubián AL. Detección de anticuerpos contra la proteína de 24 kD del VIH-1. Correlación clínico-serológica. *Rev Cubana Med Trop* 1996;48(3):188-91.

21. Rolo F, Díaz HM, Blanco M, Gessa A, Lubián AL, Izquierdo M. Niveles de carga viral plasmática en pacientes cubanos infectados por el VIH. *Biotecnología Aplicada* 2000; 17:99-101.

22. Fernández-Cruz E, Desco M, García M,

Longo N, González B, Zabay M. Immunological and serological markers predictive of progression to AIDS in a cohort of HIV-infected drug users. *AIDS* 1990; 4:987-94.

23. Pedersen C, Nielsen CM, Vestergaard BF, Gerstoft J, Krogsgaard K, Nielsen JO, et al. Temporal relation of antigenemia and loss of antibodies to core antigens to development of clinical disease in HIV infection. *Br Med J* 1987;295:567-9.

24. Farzadegan H, Chmiel JS, Odaka N, Ward L, Poggensee L, Saah A, et al. Association of antibody to human immunodeficiency virus type 1 core protein (P24), CD4+ lymphocyte number, and AIDS free time. *J Infect Dis* 1992;166:1217-22.

9. Daar ES, Mougil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991;324:961-4.

10. Mac Donell KB, Chmiel JS, Poggensee L, Wu S, Phair JP. Predicting progression to AIDS: combined usefulness of CD4 lymphocyte counts and P24 antigenemia. *Am J Med* 1990;89(6):706-12.

11. Lelie PN, Reesink HW, Bakker E, Huisman JG, Veen JH. Clinical importance of HIV antigen and anti-HIV core markers in persons infected with HIV. *N Engl J Med* 1998;318:1204-5.

12. Wittek AE, Phelan MA, Wells MA, Vujcic LK, Epstein JS, Lane HC, et al. Detection of human immunodeficiency virus core protein in plasma by enzyme immunoassay. *Ann Intern Med* 1987;107:286-92.

13. Murray HW, Godbold JH, Jurica KB, Roberts RB. Progression of AIDS in patients with lymphadenopathy or AIDS-related complex: reappraisal of risk and predictive factors. *Am J Med* 1989;86:533-8.

14. Díaz H, Rodríguez O, Sánchez M. Retrovirosis aguda. Informe de un caso. *Rev Cubana Med Trop* 1995;34(1):63-6.

15. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinical latent stage of disease. *Nature* 1993;362(6418):355-8.