

COMUNICACIÓN BREVE

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Evaluación de un ELISA para la detección de anticuerpos contra la proteína p24 del VIH-1

Dra. María de los Ángeles Ribas Antúnez,¹ Dr. Eladio Silva Cabrera,² Dra. Sonia Resik Aguirre,¹ Téc. Carina Rodríguez Valdés³ y Téc. Ileana Toraño Canto³

RESUMEN

Se evalúa el estuche DAVIH Ac p24 para la detección de anticuerpos anti p24 al VIH-1, elaborado por el Laboratorio Nacional de Referencia de SIDA (Labor-1, Cuba) y se comparan sus resultados con la técnica del Western Blot. (DAVIH-Blot. Labor 1. Cuba). Se estudió un total de 191 muestras de pacientes VIH positivos en los diferentes estadios de la enfermedad, se encontró 96 % de sensibilidad, 100 % de especificidad y 96,3 % de coincidencia entre ambas técnicas. El sistema ELISA-DAVIH anti p24, es una buena alternativa para el seguimiento de los pacientes VIH positivos.

Descriptor DeCS: WESTERN BLOTTING; SEROPOSITIVIDAD PARA VIH; TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DIAGNOSTICOS; ANTICUERPOS VIH/anal.

Después de la identificación del agente causal del sida, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se ha empleado para su diagnóstico un gran número de técnicas, dentro de las que se encuentran la determinación serológica de anticuerpos circulantes, el aislamiento viral y la medición de antígenos virales.¹

Junto a esto, ha sido necesario conocer y desarrollar técnicas para medir marcadores de infección que son de gran ayuda para predecir el pronóstico de la enfermedad, como son la detección de anticuerpo y antígeno p24, la detección de niveles de B2 microglobulina, neopterina y CD4+, ya que las manifestaciones clínicas por sí solas no constituyen buenos marcadores porque aparecen

cuando el compromiso inmunológico del paciente ya se ha establecido.²

Se han desarrollado sistemas ELISA para la detección de anticuerpos a la proteína de 24 kD del VIH con el objetivo de ser usados como marcadores sustitutivos de infección en pacientes infectados por este virus y que reciben terapia antiviral.³

Debido a la necesidad de un estricto seguimiento clínico y serológico de los pacientes infectados con VIH en Cuba, el Laboratorio de Diagnóstico de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) evaluó el estuche DAVIH Ac p24 para la detección de anticuerpos anti p24 al VIH-1 elaborado por el Laboratorio Nacional de Referencia de SIDA (Labor-1).

¹ Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Agregado. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Agregado. Laboratorio Nacional de Referencia de SIDA.

³ Técnico en Procesos Biológicos. IPK.

Se estudió un total de 191 muestras de sueros de pacientes VIH positivos en diferentes estadios de la enfermedad, según los criterios aprobados por la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁴ los que se guardaron a -20 EC hasta su uso.

El principio de la prueba es un ELISA de inhibición, donde se emplearon placas de poliestireno sensibilizadas con anticuerpos monoclonales murinos anti p24 del VIH-1; a éstas se les añadieron 50 mL de controles positivos y negativos previamente diluidos y los sueros de los pacientes puros y a diferentes diluciones 1:50, 1:250, 1: 1 250 y 1:6 250.

Se añadieron 50 mL del antígeno (proteína de 24 kD del VIH-1 purificada por inmunoafinidad) a 50 mL por pocillo y se puso a incubar 1 h a 37 EC; posteriormente se lavó la placa 6 veces con PBS tween 20 y se secó invirtiéndola en papel de filtro.

Se adicionaron 100 mL del conjugado (inmunoglobulina humana anti p24 del VIH marcada con peroxidasa) y se incubó 30 min a 37 EC.

La placa se lavó 4 veces con PBS tween 20 y luego se añadieron 100 mL del cromógeno (OPD) con peróxido de hidrógeno. Se incubó 15 min a temperatura ambiente.

La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 M, se secó cuidadosamente la base de la placa y luego se leyó a 492 nm. El valor límite se obtuvo multiplicando la media de los controles positivos y negativos por 0,5. La muestra se consideró positiva de anticuerpos p24 cuando su densidad óptica fue menor o igual que el valor límite y cuando fue mayor que éste se consideró negativa.

Se compararon los resultados del ELISA con los obtenidos por la técnica de Western Blot elaborada por el laboratorio Labor-1 (DAVIH BLOT, Cuba) cuyos criterios de positividad se basan en las recomendaciones realizadas por el fabricante. En este trabajo fue imprescindible la presencia de la banda correspondiente a la p24.

De las 191 muestras de suero estudiadas (tabla), 122 (63,87 %) fueron positivas por ambas técnicas y 5 (2,61 %) resultaron no coincidentes, positivas por Western Blot y negativas por ELISA. Se obtuvo una sensibilidad de 96,06 %, una especificidad de 100 % y una coincidencia de 97,38 %.

Todos estos sueros fueron analizados por ELISA puros y en diferentes diluciones (1:50, 1:250, 1:1 250

TABLA. Comparación de los resultados obtenidos por Western Blot y ELISA

	Western Blot		
	+	+	-
Elisa Anti p24	+	122	0
	-	5	64

Sensibilidad: 96,06 %. Especificidad: 100 %. Coincidencia: 97,38 %.

y 1:6 250), se encontró que 44 muestras presentaron anticuerpos con el suero puro, 122 tuvieron títulos en alguna de las diluciones realizadas y las 25 restantes resultaron negativas.

Para que un marcador sea considerado como sustitutivo de infección por VIH debe tener correlación con el riesgo de progresión de la enfermedad y con la evolución clínica ante una terapia antiviral aplicada.

Muchos marcadores han sido empleados solos o combinados en los pacientes infectados con VIH, uno de los más usados es la detección de anticuerpos a la proteína de 24 kD.⁵⁻⁷

Diversos autores han señalado que la disminución en el nivel de anticuerpos anti p24 actúa como marcador temprano de progresión de la enfermedad y que precede a la aparición de antigenemia en meses o años, y constituye un predictor en la disminución del conteo de linfocitos CD4+.^{8,9}

Los anticuerpos anti p24 no se detectan en el suero de pacientes con sida, pero se pueden observar diferencias en el título de anticuerpo de acuerdo con el estadio clínico, donde se encuentren.⁷

Se considera que las 5 muestras positivas detectadas por el Western Blot se deben a la mayor sensibilidad de esta técnica, que es el sistema confirmatorio más específico que se usa en el serodiagnóstico de la infección por VIH hasta el momento.³

Al estudiar ambos métodos se puede considerar que el estuche DAVIH Ac p24 para la detección de anticuerpos a la proteína de 24 kD del VIH-1, elaborado por el laboratorio Labor-1 es una buena alternativa para el seguimiento evolutivo de los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana.

SUMMARY

DAVIH AC p24 kit for detecting anti p24 antibodies of HIV-1, worked out by the National Laboratory of Reference of AIDS (Labor-1, Cuba) is assessed and results are compared to those of the Western Blot technique (DAVIH-B1ot, Labor-1, Cuba). 191 samples from HIV positive patients at various stages of the disease were analyzed. 96 % sensitivity; 100 % specificity and 96,3 % coincidence were found in both techniques. The anti p-24 ELISA-DAVIH system is a good alternative for the follow-up of HIV positive patients.

Subject headings: BLOTTING; WESTERN; HIV SEROPOSITIVITY; DIAGNOSTIC TECHNIQUES AND PROCEDURES; HIV ANTIBODIES/anal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hirsu MS, Curran J. Immunodeficiency viruses biology and medical aspects. En: *Virology* 2 ed. New York. Raven, P 1990:1545-70.
- Karlow RA, Phair JP, Friedman HB, Lyster D, Solomon RE, Dudley, et al. Infection with the human immunodeficiency virus: clinical manifestation and their relationship to immune deficiency, a report from the multicenter AIDS cohort study. *Ann Intern Med* 1987;107:474-80.
- Povolotsky J, Gold JW, Chein N, Baron P, Amstrong D. Differences in human immunodeficiency virus type I (HIV-1) anti-p24 reactivities in serum of HIV-1 infected and uninfected subjects: analysis of indeterminate Western Blot reactions. *J Infect Dis* 1991;163(2):247-51.
- WHO. Proposed WHO criteria for interpreting results from Western Blot assays for HIV-2 and HTLV-1/HTLVII. *Weekly Epidem Rec* 1990;65(37):281-3.
- Mac Donell KB, Chmiel JS, Poggensee L, Wen S, Phair JP. Predicting progression to AIDS: combined usefulness of CD4 lymphocyte counts and p24 antigenemia. *Am J Med* 1990;89(6):706-12.
- Keet IPM, Krol A, Koot M, Roos M, Wolf F, Miedema F, et al. Predictors of disease progressions in virus of the human immunodeficiency infected homosexual men with CD4+ cells < 200.10⁶/I but free of AIDS defining clinical disease. *AIDS* 1994;8:1577-83.
- Sarnagadharan MG, Veronese F, Lee S, Gallo RC. Immunologic properties of HTLV III antigens required by sero from patients with AIDS, ARC and asymptomatic. *Cancer Res* 1985;45:4574S-4578S.
- Forster SH, Osborne LM, Cheingsong - Popov R, Kenny C, Burnell R, Jeffries DJ, et al. Decline of anti p24 antibodies precedes antigenemia as correlate of prognosis in HIV-1 infection. *AIDS* 1987;1(4):235-40.
- Morand-Joubert L, Bludon H, Luable J, Petit JC, Lefrere JJ. Serum anti p24 concentration has a predictive value on the decrease of CD4 lymphocyte count higher than acid-dissociated p24 antigen. *J Med Virol* 1995;47(1):87-91.

Recibido: 28 de agosto de 1997. Aprobado: 30 de octubre de 1999.
 Dra. *María de los Ángeles Ribas Antúnez*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. E.mail: ciipk@infomed.sld.cu