

Evaluación del desempeño del sistema inmunoenzimático de diagnóstico DAVIH-HTLV-I, para la detección de anticuerpos contra el Virus Linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-I)

Evaluation of the performance of the immunoenzymatic diagnostic system DAVIH-HTLV-I for detection of antibodies against the human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I)

Lic. Kenia Romero Martínez; Lic. María T. Pérez Guevara; Lic. Maelys Hernández Almaguer; Téc. Esperanza Sánchez Dieguez; Lic. Dayamí Martín Alfonso

Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el virus linfotrópico de las células T humanas tipo I (HTLV-I), es el agente causal de la leucemia /linfoma de células T del adulto (LLTA). Resultados hallados en estudios de pesquisa para el HTLV-I en nuestro país demuestran sin lugar a dudas la presencia del mismo en nuestra población. El DAVIH-HTLV-I es un sistema microelisa para la detección de anticuerpos contra el HTLV-I en suero o plasma humano, producido por Laboratorios DAVIH. El objetivo de este trabajo fue evaluar el desempeño del sistema DAVIH-HTLV-I con vistas a su inscripción en el Registro de Diagnosticadores, del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), exigencia indispensable para su uso en nuestro país.

Métodos: se emplearon cuatro paneles de muestras en los estudios de: especificidad, sensibilidad, eficacia, concordancia con el sistema de referencia Vironostika HTLV-I/II (Biomeriëux), precisión a dos niveles: repetibilidad (intraensayos) y precisión intermedia (interensayos), y robustez.

Resultados: la evaluación mostró los siguientes resultados: especificidad 99,84 %; sensibilidad 96,49 %; concordancia 96,55 %, límite de detección correspondiente a una dilución de 1/256; elevada precisión intra e interensayos (CV menores que el 15 % y el 20 % respectivamente); sistema robusto frente a los cambios de temperatura entre 36 y 38 °C.

Conclusiones: los resultados obtenidos demostraron que el sistema DAVIH-HTLV-I

se puede emplear en el pesquisaje de anticuerpos contra el HTLV-I en la población cubana, por lo que se recomendó su registro en el CECMED.

Palabras clave: evaluación de diagnosticadores; diagnóstico de HTLV-I; ELISA/métodos.

ABSTRACT

Introduction: The human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) is the causal agent of adult T-cell leukemia / lymphoma (ATLL). Screening for HTLV-I in our country has revealed its unquestionable presence in the population. DAVIH-HTLV-I is a micro-ELISA system produced by DAVIH Laboratories for detection of antibodies against HTLV-I in human serum or plasma.

Objective: Evaluate the performance of the DAVIH-HTLV-I system with a view to registration in the Registry of Diagnostic Media Products of the Center for State Control of the Quality of Drugs (CECMED), an indispensable requirement for its use in our country.

Methods: Four sample panels were used to study the following variables: specificity, sensitivity, efficacy, concordance with the reference system Vironostika HTLV-I/II (Biomeriéux), accuracy on two levels: repeatability (intra-assay) and intermediate accuracy (inter-assay), and robustness.

Results: The following results were obtained: specificity 99.84%; sensitivity 96.49%; concordance 96.55%; detection limit for a 1/256 dilution; high intra- and inter-assay accuracy (CV below 15% and 20%, respectively); a robust system when faced with temperature changes between 36°C and 38°C.

Conclusions: Results show that the DAVIH-HTLV-I system may be used for the screening of antibodies against HTLV-I in the Cuban population. It was therefore recommended for registration with CECMED.

Keywords: evaluation of culture media products, HTLV-I diagnosis, ELISA / methods

INTRODUCCIÓN

El virus linfotrópico de las células T humanas tipo I (HTLV-I), es el agente causal de la leucemia /linfoma de células T del adulto (LLTA) y se reconoce su implicación en la etiopatogenia de la paraparesia espástica tropical (PET) y otras enfermedades invalidantes.¹ Este retrovirus comparte las mismas vías de transmisión que el VIH 1/2.² Resultados hallados en estudios de pesquisa para el HTLV-I en nuestro país demuestran sin lugar a dudas la presencia del mismo en nuestra población^{3,4}. En estos momentos, Cuba no cuenta con un diagnosticador que permita pesquisar el HTLV-I y los estuches comerciales son muy costosos.

El DAVIH-HTLV-I es un sistema microelisa para la detección de anticuerpos contra el HTLV-I en suero o plasma humano, producido por Laboratorios DAVIH. Una de las exigencias indispensables para su uso en nuestro país es su inscripción en el Registro de Diagnosticadores del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los

Medicamentos, Equipos y Dispositivos médicos (CECMED),⁵ lo cual queda establecido en su Regulación No. 8-2001. Dentro de los requisitos se encuentra la evaluación del desempeño con estos fines, que incluye la comparación del diagnosticador con otro de calidad reconocida.⁵

El objetivo de este trabajo fue la evaluación del desempeño del sistema DAVIH-HTLV-I para su registro en el CECMED.

MÉTODOS

Aspectos generales y regulatorios

La evaluación siguió la metodología establecida en el LISIDA, en el PNO 01-015⁶, la Regulación No. 47-2007 del CECMED⁷ y la NC EN 13612:2005.⁸ Como algoritmo de trabajo se ensayó una sola réplica de cada muestra. Las muestras no concordantes con el resultado esperado, tomando como referencia el sistema microELISA Vironostika[®] HTLV I/II (Biomérieux), se repitieron por duplicado y las que tuvieron resultados discrepantes en la segunda repetición se estudiaron por el sistema de Western blot DAVIH BLOT HTLV-I (Laboratorios DAVIH, Mayabeque, Cuba) como prueba confirmatoria. Las muestras con resultados indeterminados no se tuvieron en cuenta para el cálculo de la sensibilidad y la especificidad.

Técnica a evaluar

DAVIH-HTLV-I

El DAVIH-HTLV-I (Laboratorios DAVIH, Mayabeque, Cuba), es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo indirecto, para la detección de anticuerpos contra el HTLV-I en suero o plasma humano, donde la reacción ocurre en los pocillos de la microplaca sensibilizados con el antígeno del HTLV-I. Los anticuerpos presentes en las muestras y controles reaccionan con el antígeno adsorbido a la fase sólida y se forma un inmunocomplejo que es detectado por una IgG anti FC de la IgG humana conjugada a peroxidasa. La presencia de la enzima inmovilizada en los complejos se revela añadiendo un sustrato cromogénico. Finalmente la reacción se detiene con ácido sulfúrico 2M y se efectúa la lectura de absorbancia (DO) a 492 nm. El nivel de corte del ensayo es igual a 0,350 unidades de DO.

En los ensayos se siguieron estrictamente las indicaciones de uso recomendadas por el fabricante.⁹

Muestras

Para la evaluación se emplearon muestras negativas provenientes de donantes de sangre y muestras positivas, previamente caracterizadas por Vironostika[®] HTLV I/II y DAVIH BLOT HTLV-I, así como paneles de referencia de Boston Biomedica Inc (BBI Diagnostics).

Parámetros de desempeño estudiados

Especificidad

Para determinar la especificidad diagnóstica se ensayaron 1500 muestras de suero y 500 muestras de plasma de donantes sanos provenientes de Bancos de Sangre.

Para estudiar la especificidad analítica, se ensayaron 180 sueros no reactivos al HTLV-I, con factores que pudieran interferir en los resultados debido a una reactividad cruzada: 45 con anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1; 20 con anticuerpos contra el Virus de la hepatitis C; 15 con antígeno de superficie al virus de la hepatitis B, 6 con anticuerpos antinucleares (lupus eritematoso sistémico); 10 de personas con artritis reumatoide; 5 con reagina rápida reactiva; 25 de nefrópatas; 10 de personas con hepatitis A; 19 de embarazadas; 15 lipémicas y 10 hemolíticas. Se calculó la especificidad diagnóstica y analítica.¹⁰

Sensibilidad

Para su estudio se ensayaron 15 muestras pertenecientes al "Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel" (PRP 206) de la Boston Biomedica Inc (BBI Diagnostics). 14 muestras pertenecientes al "Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel" (PRP 207 M) de la Boston Biomedica INC (BBI Diagnostics). 13 muestras positivas de la firma "Panel de Brasil" y 72 muestras positivas del Panel LISIDA cuyo origen comprende diferentes regiones geográficas identificadas como zonas endémicas para este virus y pacientes cubanos seropositivos al HTLV-I. Se calculó la sensibilidad diagnóstica.¹⁰

Concordancia

Se compararon los resultados obtenidos para las muestras de los estudios de sensibilidad y especificidad, por los sistemas Vironostika HTLV-I/II y DAVIH-HTLV-I. Se calculó el porcentaje de concordancia entre ambos sistemas.¹⁰

Precisión

La precisión fue evaluada a dos niveles: Intraensayo (Repetibilidad) e Interensayo (Precisión intermedia). Para la repetibilidad, se evaluaron las variaciones en 10 réplicas de tres muestras positivas con diferentes niveles de reactividad, caracterizadas por ELISA (Vironostika HTLV I/II) y por Western blot (DAVIH BLOT HTLV-I) dentro de un mismo ensayo y para la precisión intermedia se estudiaron las variaciones de estas muestras entre ensayos con dos lotes diferentes del diagnosticador.

Se emplearon como herramientas estadísticas la media (\bar{X}), desviación típica estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).¹⁰

Robustez

Se evaluó la robustez en dos de los parámetros del ensayo: la temperatura durante la incubación de las muestras y el conjugado, y la contaminación cruzada entre muestras reactivas y no reactivas durante el proceso de lavado. Se ensayaron 12 réplicas de dos muestras reactivas y dos no reactivas al HTLV-I, a 36 °C, 37 °C y 38 °C. Se colocaron en la misma placa las muestras reactivas y no reactivas en forma alterna. Se emplearon como herramientas estadísticas la media (\bar{X}), desviación típica estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).¹⁰

RESULTADOS

Especificidad

Especificidad diagnóstica:

La Especificidad diagnóstica fue de 99,84 %. Cinco muestras de suero fueron reactivas repetidamente, de ellas tres fueron confirmadas como negativas y dos como indeterminadas que fueron excluidas del estudio. Todas las muestras de plasma estudiadas resultaron no reactivas. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados del estudio de Especificidad Diagnóstica para el sistema DAVIH-HTLV-I

Muestras trabajadas	NV	PF	Especificidad
1500 sueros	1495	3	99,79 %
500 plasmas	500	0	100 %
Total	1995	3	99,84 %

Legenda: NV: Negativos verdaderos, PF: Positivos falsos

Especificidad analítica:

En la tabla 2 podemos observar los resultados obtenidos para la especificidad analítica. La misma fue de 99,44 %. De las 180 muestras analizadas, con factores que pudieran producir reactividad cruzada, 178 fueron no reactivas por el sistema DAVIH HTLV-I y dos fueron reactivas: una positiva a VIH-1 y otra con anticuerpos antinucleares. Las dos muestras que resultaron reactivas fueron ensayadas por Western Blot DAVIH-BLOT-HTLV-I: la muestra positiva a VIH-1 se diagnosticó como indeterminada y se excluyó del estudio; la muestra con anticuerpos antinucleares se concluyó como negativa.

Sensibilidad

La sensibilidad diagnóstica del sistema fue de 96,49 %. De las 114 muestras positivas a HTLV-I, 110 fueron reactivas al HTLV-I y cuatro no reactivas: dos correspondieron a los paneles de la BBI PRP206 (muestra 01) y PRP207 (M) (muestra 02); y dos correspondieron al panel LISIDA, su origen geográfico se ubicó en la costa pacífica colombiana.

Tabla 2. Resultados del estudio de Especificidad Analítica para el sistema DAVIH-HTLV-I

Muestras trabajadas	Cantidad	NV	PF	Especificidad
VIH-1+	45	44	0	100 %
AgsHB+	15	15	0	100 %
VHC+	20	20	0	100 %
ANA+	6	5	1	83,3 %
FR+	10	10	0	100 %
RPR+	5	5	0	100 %
Nefrópatas	25	25	0	100 %
VHA+	10	10	0	100 %
Embarazadas	19	19	0	100 %
Lipémicas	15	15	0	100 %
Hemolíticas	10	10	0	100 %
Total	180	178	1	99,44 %

Leyenda: NV: Negativos verdaderos, PF: Positivos falsos

Concordancia

Los resultados obtenidos en el estudio comparativo de los sistemas DAVIH-HTLV-I y Vironostika HTLV-I/II se pueden observar en la tabla 3. Los mismos mostraron una concordancia de 96,55 %. Esto se debe a cuatro muestras positivas que fueron no reactivas por el sistema DAVIH HTLV-I.

Tabla 3. Resultados del análisis de la concordancia entre los sistemas DAVIH-HTLV-I y Vironostika HTLV-I/II

n=116	Vironostika HTLV-I/II			
		Positivo	Negativo	Total
DAVIH-HTLV-I	Positivo	110	0	110
	Negativo	4	2	6
	Total	114	2	116

Precisión

Los resultados de este estudio se resumen en las tablas 4 y 5. Para la repetibilidad, excepto en la muestra tres, cuyo CV fue de 12,98 %, no se apreciaron valores de CV superiores al 10 %. En el caso de la precisión intermedia los resultados mostraron CV que fueron inferiores al 20 % para las muestras 1 y 3, y la muestra 2 mostró un CV de 22,34 %.

Tabla 4. Resultados del estudio de repetitividad para el sistema DAVIH-HTLV-I

	Lote 1			Lote 2		
	X	D.S.	C.V.	X	D.S.	C.V.
Muestra 1	1,738	0,024	1,38	1,635	0,007	0,43
Muestra 2	0,661	0,025	3,76	1,1017	0,056	5,46
Muestra 3	0,414	0,054	12,98	0,471	0,013	2,81

Legenda: X: Media, DE: Desviación Estándar, CV: Coeficiente de variación

Tabla 5. Resultados del estudio de Precisión intermedia para el sistema DAVIH-HTLV-I

	Lotes 1201 y 1202		
	X	DE	CV
Muestra 1	1,687	0,056	3,332
Muestra 2	0,839	0,187	22,34
Muestra 3	0,443	0,048	10,87

Legenda: X: Media, DE: Desviación Estándar, CV: Coeficiente de variación

Robustez

En la evaluación de la robustez, los CV para las 12 réplicas de cada una de las muestras reactivas y no reactivas, fueron inferiores al 20 % a las tres temperaturas estudiadas: 36, 37 y 38°C; no observamos contaminación cruzada entre las muestras reactivas y no reactivas durante los procesos de lavado.

DISCUSIÓN

Cuba no cuenta con un diagnosticador que permita el pesquisaje del HTLV I. Esto puede estar dado por las bajas tasas de seroprevalencia reportadas y por las consideraciones económicas sobre el alto costo de la incorporación de este ensayo a los sistemas de detección en la red nacional de laboratorios para la vigilancia epidemiológica y la certificación de la sangre. La evidencia de la propagación del HTLV-I por contacto sexual y a través de la sangre, hace que sea útil establecer una serovigilancia de las infecciones por retrovirus no VIH.¹¹

La factibilidad de uso del DAVIH-HTLV-I, de producción nacional, en el pesquisaje de la infección por HTLV-I en suero o plasma humano, se demostró con los resultados del desempeño del sistema.

La especificidad diagnóstica mostró resultados que concuerdan con lo esperado para este tipo de ensayo.^{7,10} En el estudio de especificidad analítica se apreciaron reacciones inespecíficas en las muestras con anticuerpos antinucleares y con anticuerpos contra el VIH-1; lo cual se ha descrito que pueda ocurrir por la presencia de una enfermedad autoinmune¹² y por la reactividad cruzada que puede existir entre dos retrovirus¹³ respectivamente.

Aunque los resultados de sensibilidad fueron inferiores a los valores esperados para un sistema de pesquiasaje (99-100 %),^{7,10} debemos tener en cuenta que el 100 % de las muestras de pacientes seropositivos cubanos incluidas en el panel LISIDA fueron reactivas, lo cual demuestra la utilidad del sistema en nuestra población. Este porcentaje pudo verse afectado por el número pequeño de muestras empleados en el estudio debido a que el HTLV-I es menos transmisible y ha sido menos estudiado que el VIH.^{1,4}

Otro de los factores que puede haber influido en los resultados de sensibilidad y especificidad es el hecho de que el antígeno empleado para recubrir la fase sólida es natural y se ha descrito que cuando se emplea este tipo de antígeno en ensayos inmunoenzimáticos, disminuye la posibilidad de unión de las secuencias inmunodominantes a la fase sólida y también existe la posibilidad de que los componentes celulares enmascaren los resultados por la respuesta cruzada de los anticuerpos inespecíficos.¹⁴

La concordancia con el sistema de referencia Vironostika HTLV I/II no difiere de otros estudios comparativos realizados entre diferentes técnicas para la detección de HTLV-I, donde se ha encontrado que la prueba de ELISA ha mostrado niveles de concordancia significativamente mayores que los observados en otras pruebas como el Western Blot o la PCR (80 %).¹⁵

Del estudio de precisión podemos decir que, excepto para la muestra 3 de la repetibilidad y 2 de la precisión intermedia, los CV obtenidos concuerdan con lo referido por Ochoa¹⁰ y por el CECMED,⁷ quienes plantean que en los inmunoensayos enzimáticos el coeficiente de variación no debe superar el 10 % en la prueba de precisión intraensayo y el 20 % en la interensayo; y se consideran óptimos los inferiores al 5 % y al 10 % respectivamente.

En el caso de la muestra 3 de la repetibilidad, se observó una mayor dispersión en los valores, lo cual se traduce en una disminución de la precisión; que puede explicarse debido a que los mismos se encuentran muy cercanos al valor de corte.^{16,17} Para la muestra 2 de la precisión intermedia, el CV obtenido puede deberse a la diferencia que existe entre los antígenos que recubren la fase sólida de ambos lotes.¹⁷

En el estudio de robustez, los resultados están acorde a lo descrito por Ochoa y el CECMED, para los ensayos inmunoenzimáticos.^{7,10} Se demostró la capacidad del método para brindar resultados consistentes a 36, 37 y 38 °C.

Los resultados obtenidos avalan a este ensayo como una herramienta importante en el diagnóstico de la infección por HTLV-I, por lo que se recomendó su registro ante el órgano regulador de la república de Cuba (CECMED).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shuh M and Beilke M. The Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-I): New Insights into the Clinical Aspects and Molecular Pathogenesis of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) and Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-Associated Myelopathy (TSP/HAM). *Microsc Res Tech* 2005; 68: 176-96.
2. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soarez BC and Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 2005; 24: 6058-68.
3. Navea L, Dubed M, Álvarez G, Blanco M, Díaz HM, Beguerías R, et al. Aislamiento del virus linfotrópico de células T humano tipo I de un paciente con paraparesia espástica tropical: primer reporte en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2008; 60(2): 190-6.
4. Hernández P, Rivero R, Ballester M, Navea L, Matutes E, Catovsky D, et al. Very low seroprevalence of HTLV-I/II in Cuba: Antibodies in blood donors and in hematological and nonhematological patients. *Vox Sang* 1991; 61: 277-78.
5. CECMED. Requisitos para el registro de diagnosticadores. La Habana, Cuba. Regulación No. 8; 2001: 1-13.
6. LISIDA. Evaluación de diagnosticadores. Mayabeque, Cuba. PNO 01-015. edición 05; 2011: 1-7.
7. CECMED. Requisitos para la Evaluación del Desempeño de los Diagnosticadores. La Habana, Cuba. Regulación No. 47; 2007: 2-36.
8. Norma Cubana. Evaluación del funcionamiento de los Diagnosticadores. NC EN 13612; 2005: 6-11.
9. LISIDA. Literatura interior. Mayabeque, Cuba. Edición 04; 2011.
10. Ochoa Rolando, Martínez Juan C, Ferriol Xenia, Estrada Eric, García Ana M, Blanco Rosa et al . Guía para la estandarización de técnicaGuía técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *Vaccimonitor [revista en la Internet]*. 2000 Sep [citado 2015 Ene 10]; 9(3): 13-18. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2000000300003&lng=es.
11. Ballester JM. El Programa de Medicina Transfusional de Cuba. *Rev Panam Salud Pública* 2003; 13(2/3): 160-64.
12. Silva E, Pérez MT, Lubián AL, De la Fuente JL, Navea L, Cruz O. Pesquisaje de anticuerpos contra el virus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-I) en donantes de sangre y grupos de riesgo. *Rev Cubana Med Trop* 1997; 49(1): 24-7.
13. Abrams A, Akahata Y, Jacobson S. The Prevalence and Significance of HTLV-I/II Seroindefinite Western Blot Patterns. *Viruses* 2011; 3: 1324-325.
14. Alcaro MC, Peroni RP, Papini AM. Synthetic peptides in the diagnosis of HIV infection. *Current Prot and Peptides Sci* 2003; 4: 285-90.
15. Thorstenson R, Albert J, Andersson S. Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. *Transfusion* 2002; 42(6): 780-91.

16. OIE: Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. Principles of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases. 5ta Edition, Part I Cap I.1.3; 2004.

17. Ochoa, RF. Validación de los inmunoensayos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. En: Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Finlay Ediciones, Ciudad de La Habana, Cuba. 2004:57-75.

Recibido: 11 de enero de 2015.

Aprobado 20 de febrero de 2015.

Lic. Kenia Romero Martínez. Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA). Carretera de Tapaste y Autopista Nacional. La Habana, Cuba. Correo electrónico: calidad@dcn.co.cu; cicdc@infomed.sld.cu