



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Uso de un péptido sintético de la glucoproteína 36 del VIH 2 en mezclas de antígenos para el inmunodiagnóstico de la infección por VIH tipo 1 y 2



Grisell Ramos Martínez^a, Marcos Antonio Valdespino-Díaz^{a,*}, Milenen Hernández Marín^b, Elizabeth Valle Carvajal^c, María Elena Selles León^a y Lilliam Pozo Peña^a

^a Laboratorio de Retrovirus, Centro de Inmunoensayo, La Habana, Cuba

^b Laboratorio de Síntesis de Péptidos, Centro de Inmunoensayo, La Habana, Cuba

^c Facultad de Biología, Universidad de la Habana, La Habana, Cuba

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 24 de abril de 2014

Aceptado el 12 de diciembre de 2014

On-line el 29 de enero de 2015

Palabras clave:

VIH

Péptido sintético

gp36

ELISA

R E S U M E N

Introducción: La glucoproteína gp36 del VIH2 es muy utilizada en los ELISA. Pretendimos evaluar los índices de diagnóstico de mezclas de antígenos con el péptido sintético del VIH 2 gp36 (5).

Métodos: Se prepararon 5 mezclas con gp36 (5) y proteínas recombinantes del VIH 1/2. Se evaluaron 1.306 muestras con el UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT como referencia.

Resultados: La mezcla (V-1) mostró muy buena concordancia respecto a la referencia.

Conclusión: La variante V-1 demostró elevada eficacia en el inmunodiagnóstico del VIH 1/2.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Use of a synthetic peptide of HIV-2 glycoprotein 36 in antigen mixtures for the immunodiagnosis of HIV types 1 and 2

A B S T R A C T

Introduction: The HIV-2 glycoprotein 36 (gp36) is often used in ELISA. An evaluation of the diagnostic indexes of antigen mixtures with a synthetic peptide of HIV 2 gp36 (5) is performed in this study.

Methods: Five mixtures of gp36 (5) and the recombinant proteins of HIV 1/2 were prepared. A total of 1306 samples were evaluated with UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT used as reference.

Results: The variant (V-1) showed very good agreement as regards the reference method.

Conclusion: The V-1 variant was shown to be highly effective in the immunodiagnosis of HIV 1/2.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Keywords:

HIV

Synthetic peptide

gp36

ELISA

Introducción

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, en el mundo existen más de 37 millones de personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (VIH 1/2), agentes causales del síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (sida)¹.

El rápido progreso de la infección por este virus ha impuesto el desarrollo de pruebas diagnósticas más simples, de bajo costo y de alta sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos anti-VIH 1/2 en muestras de sangre. Entre las más empleadas se encuentran técnicas inmunoenzimáticas de tercera y cuarta generación, como la quimioluminiscencia (ChLIA) y los ELISA². Los antígenos usados en el recubrimiento de los ELISA pueden ser producto de lisados virales, proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, siendo estos últimos ampliamente utilizados en la actualidad, en busca de mayor sensibilidad y especificidad³.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: marcos.valdespino@cie.cu (M.A. Valdespino-Díaz).

Tabla 1
Composición de las variantes de mezclas de antígenos empleadas

Variantes de diluciones	Composición
UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT	gp120rec (0,5 µg/ml) + gp41rec (1 µg/ml) + p24rec (1 µg/ml) + gp36rec (0,5 µg/ml) + p24s
V-1	gp120rec (0,5 µg/ml) + gp41rec (1 µg/ml) + p24rec (1 µg/ml) + gp36 (5)s (1 µg/ml)
V-2	gp120rec (0,5 µg/ml) + gp41rec (1 µg/ml) + p24rec (1 µg/ml) + gp36 (5)s (2 µg/ml)
V-3	gp120rec (0,5 µg/ml) + gp41rec (1 µg/ml) + p24rec (1 µg/ml) + gp36 (5)s (3 µg/ml)
V-4	gp120rec (0,5 µg/ml) + gp41rec (1 µg/ml) + p24rec (1 µg/ml) + gp36 (5)s (4 µg/ml)

gp: glucoproteína; p: proteína; rec: recombinante; s: sintético.

En el caso específico del VIH 2, la glucoproteína de transmembrana gp36 es la más utilizada en el serodiagnóstico, y está descrito que péptidos sintéticos de esta glucoproteína muestran una elevada antigenicidad y especificidad en la detección de anticuerpos en sueros de pacientes infectados con VIH 2⁴.

Es por ello que en este trabajo nos propusimos como objetivo evaluar los índices diagnósticos: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de diferentes mezclas de antígenos, que usan el péptido sintético monomérico del VIH2 gp36 (5).

Métodos

Síntesis química, purificación y caracterización del péptido gp36 (5) del VIH-2

El péptido gp36 (5) se obtuvo en el Centro de Inmunoensayo (CIE, Cuba) mediante síntesis química en fase sólida, empleando la estrategia Boc en bolsas de polipropileno⁴.

Proteínas recombinantes de los VIH 1/2

Las proteínas recombinantes gp120, gp41 y p24 del VIH 1, y gp36 del VIH 2, fueron suministradas por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus (CIGB SS), Cuba.

Recubrimiento de las placas y ensayo UltramicroElisa (UMELISA)

Con el péptido sintético gp36 (5) y las proteínas recombinantes se prepararon 5 mezclas diferentes a las concentraciones deseadas (tabla 1). Se recubrieron entonces placas de poliestireno de 96 pocillos (placas UMELISA, Greiner Bio-One, Alemania). El ensayo se realizó según instrucciones del fabricante para el estuche UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT (TecnoSUMA Internacional S.A.).

Análisis e interpretación de los resultados

Para la validación de los resultados se utilizó un programa de computación para trabajo con la tecnología SUMA (Strips Reader Software SRS V. 9.0.). El nivel de corte (NC) utilizado en el procesamiento de los datos fue de 0,27, valor de corte del estuche UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT (TecnoSUMA Internacional S.A.) usado como referencia en el estudio.

El valor de relación (VR) se definió como:

$$VR = \frac{(Fi - BB)}{(P - BB)}$$

donde Fi: fluorescencia de la muestra; BB: valor promedio del blanco; P: menor valor de fluorescencia de los duplicados del control positivo.

Aquellas muestras cuya media de los duplicados tuvieron un VR/NC ≥ 1 fueron consideradas reactivas, y las clasificadas como repetir fueron revaluadas hasta alcanzar un resultado preciso.

Muestras de suero

Se emplearon 10 paneles de sueros.

Los paneles 1-7 incluyeron todas las muestras positivas al VIH 1 y/o 2 (174) y 9 negativas. Del panel 8-10 se encontraron las restantes muestras negativas (1.123), incluyendo algunas reactivas al virus de la hepatitis B (VHB [n = 30]), virus de la hepatitis C (VHC [n = 32]), virus linfotrópico de células T humanas (HTLV [n = 10]), virus dengue (n = 10), *Mycobacterium leprae* (n = 3) y *Trypanosoma cruzi* (n = 5), además de 10 muestras hemolíticas.

Análisis estadístico de los resultados

Con el apoyo del programa EPIDAT 3.1 se calcularon los índices diagnósticos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos. Con el programa estadístico Tonystat se analizó el ajuste a la distribución normal de los resultados de las muestras no reactivas de los paneles 1-7. Se seleccionó la mejor de las variantes de antígenos con el apoyo del error relativo, calculado como:

$$Er = \sum_{i=1}^n abs \frac{(O_i - E_i)}{E_i}$$

donde O: valor observado; E: valor esperado.

Además, se calculó la eficacia:

$$E = [(VP + VN)/(VP + FP + FN + VN)] * 100$$

donde VP: verdaderos positivos; VN: verdaderos negativos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos.

Mediante el índice kappa (k) se analizó la concordancia entre UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT y la más idónea de las variantes de antígenos.

Resultados

Al analizar los paneles 1-7, todas las variantes de mezclas de antígenos detectaron la totalidad de las muestras reactivas, para un 100% de sensibilidad. Así también, obtuvieron valores de VR/NC < 1 ante las muestras negativas incluidas en dichos paneles (tabla 2). Sin embargo, la variante 1 tuvo mayor similitud con UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT, al presentar el menor valor de error relativo (tabla 2). Por tal motivo se eligió solo esta mezcla para continuar el estudio.

Con el objetivo de evaluar la especificidad de la variante de antígenos V-1, se emplearon las muestras descritas en los paneles 8-10. Para todas ellas, la mezcla de antígenos V-1 mostró un 100% de especificidad.

Después se realizó el cálculo de los valores predictivos negativos y positivos, y de la eficiencia, teniendo en cuenta los resultados de todos los paneles. Tanto para V-1 como para la referencia se obtuvo un 100% en todos los parámetros. Finalmente el índice kappa evidenció una concordancia muy buena (igual a 1) entre V-1 y UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT.

Tabla 2
Resultados y error relativo de las variantes de antígenos frente a las muestras negativas para VIH (paneles 1-7)

UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT	V-1	V-2	V-3	V-4
<i>Panel 1</i>				
0,44	0,52	0,67	0,74	0,78
0,22	0,22	0,37	0,41	0,52
0,26	0,22	0,33	0,41	0,59
<i>Panel 2</i>				
0,63	0,70	0,78	0,85	0,85
0,44	0,56	0,63	0,63	0,74
0,52	0,59	0,70	0,78	0,70
<i>Panel 3</i>				
0,15	0,19	0,30	0,44	0,52
0,22	0,19	0,22	0,33	0,44
<i>Panel 4</i>				
0,78	0,59	0,67	0,74	0,85
<i>Error relativo</i>				
–	1,47	3,60	5,89	8,34

Los valores de las muestras se expresan como (VR/NC), y son consideradas positivas cuando VR/NC \geq 1.

Discusión

El uso de péptidos sintéticos en la fase sólida de los ELISA ha posibilitado aumentar su sensibilidad y su especificidad⁵. Por tanto, el empleo del antígeno sintético gp36 (5) del VIH 2 con proteínas recombinantes del VIH 1 podría ser eficaz en el diagnóstico del VIH 1/2.

La elevada sensibilidad de las variantes de antígenos reflejó su valía para detectar anticuerpos en sueros positivos al VIH. Sobre todo el péptido sintético gp36 (5), que permitió el reconocimiento de las 26 muestras positivas al VIH 2 empleadas, coincidiendo con otros autores, que informaron alta sensibilidad y especificidad para este péptido de forma independiente^{4,6}.

La variante V-1 evidenció, además, la alta especificidad de los antígenos utilizados en el ensayo, sobre todo porque otros autores han descrito homología de secuencias entre el VIH y el HTLV⁷ y discrepancia en la interferencia de muestras hemolíticas en los inmunoensayos⁸. Resultados similares han sido descritos ante sueros positivos a los agentes estudiados en este trabajo^{9,10}. No obstante, es necesario ampliar la población de este tipo de muestras que esclarezcan la interferencia de las mismas en nuestro ensayo.

Además, la reducción del tiempo de obtención, la disminución del peligro de contaminación durante el proceso de síntesis, la alta reproducibilidad y la elevada pureza de los péptidos sintéticos con respecto a las proteínas recombinantes⁹ validan las ventajas que tendría el uso del péptido gp36 (5) en el ensayo. También dotaría

al Centro de Inmunoensayo de independencia productiva, ya que la proteína recombinante gp36 del UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT es adquirida de manera comercial.

De forma general se evaluaron diferentes variantes de mezclas de antígenos que incluyeron un péptido sintético de la proteína de transmembrana del VIH2 [gp36 (5)] las cuales posibilitaron la correcta identificación de todas las muestras positivas analizadas. De las variantes probadas, V-1 presentó el menor error relativo, asemejándose más al ensayo de referencia UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT. Las altas sensibilidad y especificidad de la variante V-1 demostró su eficacia en el inmunodiagnóstico de los sueros reactivos al VIH 1 y 2 utilizados.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Queremos hacer notar la labor decisiva para la culminación de este trabajo de la MSc. Idialis Hernández Spengler, la Lic. Dunia Clara Bequer Ariza y la MSc. Aurora Delahanty Fernández, todas del Centro de Inmunoensayo. Gracias por sus aportes.

Bibliografía

1. ONUSIDA. Situación de la Epidemia de Sida. 2012 [consultado 20 Nov 2013]. Disponible en: www.data.unaids.org/pub/EPISlides/2012/2012_epiupdate_es.pdf
2. Alonso R, Lopez P, Suarez M, Bouza E. Evaluation of a new automated chemiluminescence immunoassay for simultaneous but separate detection of human immunodeficiency virus antigens and antibodies. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1467–70.
3. Velumani S, Ho H-T, He F, Musthaq S, Prabakaran M, Kwang J. A NOVEL PEPTIDE ELISA for universal detection of antibodies to human H5N1 influenza viruses. *PLoS ONE.* 2011;6:20737.
4. Hernández M, Pozo L, Amat M, Rodríguez C, Higginson D. Comparación de la antigenicidad de un péptido sintético y una proteína recombinante de la región de transmembrana (gp 36) del VIH-2. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2009;40.
5. Gomara MJ, Haro I. Synthetic peptides for immunodiagnosis of human diseases. *Curr Med Chem.* 2007;14:531–46.
6. Hernández M, Selles ME, Márquez Y, Pozo L, Vázquez R. Péptidos sintéticos para el inmunodiagnóstico de retrovirus humanos [reportes]. *Biología Aplicada.* 2003;20.
7. Lower R, Boller K, Hasenmaier B, Kormacher C, Muller-Lantzsch N, Kurth R, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science.* 1993;220:868–70.
8. Rodríguez-Granger J, Camacho-Muñoz E, Sampedro A, Rosa-Fraile M. Interferencia de la hemólisis en las determinaciones serológicas [cartas científicas]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:533–7.
9. Ramos G. Estudio y selección de péptidos sintéticos para la detección del virus de la inmunodeficiencia humana [tesis de maestría]. La Habana (Cuba): Universidad de La Habana; 2011.
10. Malacrida C, Capriotti GA, Torruella M. Evaluación de un nuevo Elisa para la detección de anticuerpos Anti-HIV-1 y Anti-HIV-2 de 3.ª generación. *NotiWiener.* 2011;153.