

INFORME BREVE

Diagnóstico serológico de HTLV-1/2: combinación de técnicas de tamizaje para definir el estatus serológico en donantes de sangre

Claudia Moreno^{a,*}, Marcos Balangero^b, María G. Barbás^a, Analía Cudolá^a
y Sandra Gallego^{a,b}

^a Departamento Laboratorio Central, Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, Córdoba, Argentina

^b Laboratorio de Virus Linfotrópicos Humanos: Retrovirus HIV y HTLV, Instituto de Virología «Dr. J. M. Vanella», Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

Recibido el 15 de febrero de 2013; aceptado el 28 de mayo de 2013

PALABRAS CLAVE

HTLV-1/2;
Algoritmo;
Tamizaje

Resumen

Con el objetivo de reducir el número de resultados falsos reactivos al determinar los anticuerpos contra HTLV-1/2, se evaluaron algoritmos alternativos. De 20 210 muestras estudiadas, el 0,37 % (74/20 210) fueron reactivas por ELISA Murex Abbott. De estas, 23 se confirmaron positivas por inmunofluorescencia indirecta y 51 fueron negativas; valor predictivo positivo (VPP) 31,08 %. Al combinar ELISA Murex con aglutinación de partículas de gelatina (AP) y con ELISA MP, se obtuvieron los siguientes resultados: 26/74 resultaron reactivas por Murex y AP, VPP 88,5 %, y 32/74 reactivas con Murex y ELISA MP, VPP 71,8 %. Del análisis de la curva ROC se determinó que para un valor de RP de 4,74 por Murex, la sensibilidad, la especificidad, el VPP y el VPN son 100 %, 98,04 %, 95,8 % y 100 %, respectivamente. Proponemos que las muestras reactivas por ELISA Murex con $RP \leq 4,74$ sean retesteadas por duplicado por AP, y que las que resulten concordantemente no reactivas sean definidas como negativas para HTLV-1/2.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

HTLV-1/2;
Algorithm;
Screening

Serological diagnosis of HTLV-1/2: Combination of screening assays to define the serological status in blood donors

Abstract

Alternative algorithms were evaluated in order to reduce the number of false reactive results for antibodies against HTLV-1/2. From 20,210 samples tested, 0.37% (74/20,210) was reactive by ELISA Murex. Of these, 23 were confirmed as positive by the indirect immunofluorescence assay whereas 51 were negative, being the positive predictive value (PPV) 31.08%. From a combination of the ELISA Murex assay with the particle agglutination

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cbabiologiamolecular@gmail.com (C. Moreno).

assay (PA) and ELISA MP, the following results were obtained: 26/74 were reactive by ELISA Murex and PA, PPV 88.5% and 32/74 were reactive by ELISA Murex and ELISA MP, PPV 71.8%. The ROC curve analysis determined that for an RP 4.74, the values for sensitivity, specificity, PPV and NPV by ELISA Murex were 100%, 98.04%, 95.8% and 100%, respectively. We propose that reactive samples by ELISA Murex with an $RP \leq 4.74$ should be retested in duplicate by PA, and the resulting concordantly nonreactive samples should be defined as negative for HTLV-1/2.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Los virus linfotrópicos de células T humanas tipo 1 y 2 (HTLV-1/2) son retrovirus pertenecientes a la familia *Retroviridae*. Estos virus producen una infección persistente lenta en el huésped que infectan. El virus HTLV-1 es el agente etiológico de la leucemia/linfoma a células T del adulto (ATL) y de la paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada al HTLV-1 (TSP/HAM)⁹. Está asociado, además, al desarrollo de otras entidades clínicas como artropatía inflamatoria crónica, síndrome de Sjögren, polimiositis, uveítis, alveolitis, estrongiloidiasis y dermatitis infecciosa⁹. Por otro lado, el virus HTLV-2 ha sido relacionado con neoplasias de células T y casos de enfermedad neurodegenerativa¹⁴, aunque su rol como agente productor de patologías permanece aún poco claro.

El HTLV-1/2 tiene una distribución mundial, se estima que en el mundo hay entre 15 y 25 millones de personas infectadas con HTLV-1 y que el riesgo de desarrollar alguna de las patologías asociadas al virus es del 3-5 %⁹. El HTLV-1 es endémico en Japón, especialmente en las islas del sudoeste, en determinadas regiones de África, Melanesia, en las islas Seychelles, Australia y algunos países de Sudamérica como Brasil, Venezuela, Colombia, Perú, Surinam, Guayana Francesa, Chile, Paraguay y Argentina. El virus HTLV-2 es endémico entre aborígenes de América Latina y algunas tribus de África⁹. En Argentina, se demostró que hay una región endémica para el virus en el norte del país, donde la prevalencia en donantes de sangre es entre 0,6 % y 1 % (Jujuy 1 %, Salta 0,7 %, Formosa 0,6 %), y otra región no endémica en el centro y sur del país, donde la prevalencia en donantes de sangre varía entre 0,01 % y 0,2 %⁸.

El diagnóstico de las infecciones por HTLV-1/2 se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos en suero o plasma utilizando ensayos de tamizaje: inmunoensayo ligado a enzimas [*enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)] o aglutinación de partículas de gelatina (AP). Todas las muestras repetidamente reactivas por las pruebas de tamizaje requieren la confirmación de la presencia de anticuerpos específicos para HTLV-1/2 por metodologías confirmatorias. El *Western blot* (Wb) es la técnica de referencia para la confirmación de la infección y es la que define un resultado positivo o negativo para anticuerpos contra HTLV-1/2⁹.

Existen diferentes criterios para clasificar una muestra como positiva; así, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, una muestra es positiva para anticuerpos anti-HTLV-1 si presenta alguna banda específica correspondiente a las proteínas de los genes *env*, gp46 o gp62/68, y alguna de las bandas de las proteínas específicas de los genes *gag*, p19, p24 o p53. Por otro lado, el criterio de la Red Europea de Investigación es más estricto al definir una muestra como

positiva, ya que es necesaria la presencia de las bandas correspondientes a p19 y p24 del gen *gag*, como así también las bandas correspondientes a las proteínas de la envoltura viral rgp21 y rgp46-l¹⁵.

Una proporción importante de muestras con resultados reactivos por ELISA para HTLV-1/2 resulta en un patrón de bandas insuficiente por Wb, presentando las muestras reactividad hacia uno o más de los antígenos incorporados en la prueba, pero con un perfil de bandas insuficiente para ser consideradas como positivas. Los individuos que presentan estos resultados son categorizados serológicamente como indeterminados. Estos perfiles indeterminados por Wb para HTLV-1/2 han sido descritos en todo el mundo y son más frecuentes en áreas tropicales^{1,9}.

El agente o los agentes causales y la trascendencia médica del estado de indeterminado para HTLV-1/2 están en la actualidad poco claros. Se han sugerido varias explicaciones posibles, incluyendo: (I) reactividad cruzada con otros agentes infecciosos (por ejemplo, *Plasmodium* sp.), (II) infección con partículas de HTLV-1 defectivas, (III) infección con retrovirus nuevos que tienen alta homología con HTLV-1, y (IV) infección con HTLV-1 en individuos que presentan cargas virales que están por debajo del alcance de los métodos que se utilizan para la detección¹.

Por otro lado, es importante mencionar que en la población de donantes de sangre es muy frecuente encontrar resultados falsos reactivos por las técnicas de tamizaje para HTLV-1/2^{3,12}, los cuales deben ser posteriormente confirmados por Wb y que en su mayoría resultan indeterminados. La frecuencia de los resultados indeterminados por Wb varía según la prevalencia del virus en la región, desde 0,02 % en áreas no endémicas a 10-50 % en áreas endémicas^{4,11,12}. Debido a esto, resulta necesario evaluar y seleccionar el mejor algoritmo de tamizaje de anticuerpos contra HTLV-1/2 disponible en los bancos de sangre, con el objeto de reducir los resultados falsos reactivos que deben ser confirmados. Se han propuesto recientemente algoritmos alternativos de tamizaje para este virus, los cuales ya se están utilizando en bancos de sangre de otros países; estos algoritmos incorporan técnicas moleculares en el *screening* serológico².

En nuestra experiencia, los resultados falsos reactivos por ELISA Murex Abbott que presentan en promedio una relación de positividad ($RP = DO \text{ muestra} / \text{cut-off}$) de hasta 2, aproximadamente, resultan frecuentemente indeterminados persistentes por Wb. En un individuo con perfil indeterminado persistente por Wb, las técnicas de *screening* continúan resultando reactivas y el Wb indeterminado en muestras sucesivas obtenidas a diferentes tiempos, por lo que el diagnóstico permanece inconcluso. Esto se ha descrito fre-

cuentemente en poblaciones como las de donantes de sangre^{2,11}. Además, la presencia de dichos perfiles de Wb indeterminados en áreas no endémicas generalmente no estaría asociada a una infección por HTLV-1/2^{1,2,11}.

Con el objetivo de reducir el número de muestras reactivas que requieren ser confirmadas, en el presente trabajo se propone modificar el algoritmo de diagnóstico para HTLV-1/2 que se utiliza actualmente en nuestra institución, considerando en el algoritmo el valor del RP de la técnica de tamizaje utilizada en conjunto con la combinación de dos o más técnicas de tamizaje complementarias.

Desde octubre de 2011 a setiembre de 2012, en el Laboratorio de Serología Pre-transfusional del Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba, Ministerio de Salud, se estudió un total de 20 210 muestras de suero correspondientes a donantes de sangre. La detección de anticuerpos específicos contra el virus HTLV-1/2 en dichas muestras se realizó utilizando la técnica ELISA de Murex Abbott (HTLV-I+II, Murex Diagnostics, Datford, Reino Unido). Las muestras que resultaron reactivas por ELISA de Murex fueron retesteadas por las técnicas de aglutinación de partículas de gelatina (Serodia HTLV-1, Fujirebio Inc., Tokio, Japón) y ELISA (MP HTLV-I/II 4.0, MP Diagnostics), como técnicas de tamizaje complementarias. Todas las técnicas fueron realizadas y sus resultados interpretados siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. La confirmación de las muestras con resultados reactivos por tamizaje se realizó por la técnica de inmunofluorescencia indirecta *in house* (IFI)⁵. Esta última técnica fue realizada siguiendo el procedimiento descrito previamente⁵.

De las 20 210 muestras estudiadas, el 0,37 % (74/20 210) fue reactivo por ELISA Murex. De estas, 23 fueron confirmadas como positivas por IFI y 51 como negativas, lo que resulta en un valor predictivo positivo (VPP) de la prueba de 31,08 % (23/74).

Al combinar la técnica de ELISA de Murex con las otras metodologías utilizadas, se obtuvieron los siguientes resultados: 26/74 muestras resultaron concordantemente reactivas por ELISA Murex y aglutinación de partículas de gelatina. De ellas, 23 fueron positivas por IFI y 3 negativas, lo que originó un VPP de 88,5 %. Al combinar el ELISA Murex con el ELISA MP, 32 muestras resultaron concordantemente reactivas. De ellas, 23 resultaron positivas por IFI y 9 negativas, lo que arroja un VPP de 71,8 %.

Al evaluar los valores de RP obtenidos por la técnica de ELISA Murex, se observó que de las 74 muestras reactivas, las 23 que resultaron positivas por IFI tenían un RP entre 7,18 y 13,03. La mayoría de las muestras que se confirmaron como negativas tenían valores de RP bajos (entre 0,97 y 4,74), mientras que para una sola muestra negativa se obtuvo un RP de 9,33.

Se realizó un análisis estadístico basado en curva ROC utilizando el *software* MedCalc versión 12.3.0.0 (fig. 1). En este análisis se identificó el valor de RP de ELISA Murex para el cual la técnica alcanza una sensibilidad y una especificidad óptimas; se definió así el valor de RP por debajo del cual se encuentran la mayoría de los valores correspondientes a falsos positivos. En este análisis, para un valor de RP por ELISA Murex de 4,74, la sensibilidad fue de 100 % (IC 95 %: 85,2-100), especificidad 98,04 % (IC 95 %: 89,6-100), VPP 95,8 % (IC 95 %: 78,9-99,9) y el VPN de la prueba fue de 100 % (IC 95 %: 92,9-100).

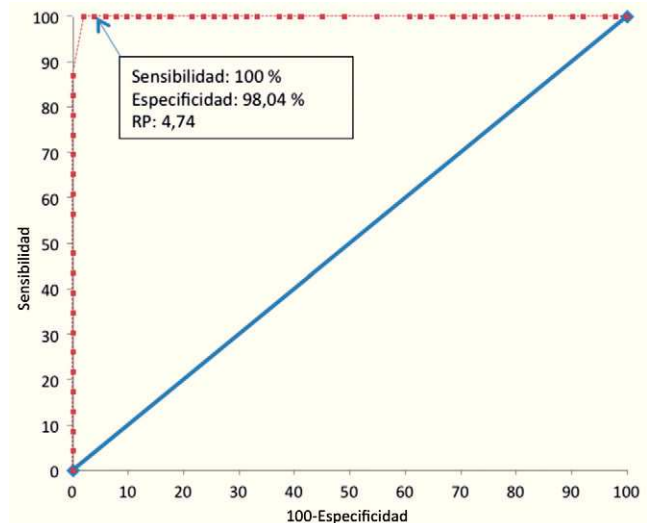


Figura 1 Curva ROC para diferentes valores de RP de la técnica de ELISA Murex Abbott en la detección de anticuerpos contra HTLV-1/2. La sensibilidad y especificidad (95 % IC) son 100 % (85,2%-100 %) y 98,04 % (89,6 %-100 %) para un RP de 4,74. El área debajo de la curva es 0,997 ($p < 0,0001$). RP: relación de positividad.

Los resultados reactivos por ELISA con perfiles de Wb indeterminados son muy frecuentes en poblaciones de bajo riesgo como los donantes de sangre, los cuales a menudo resultan ser falsos reactivos^{1,11,12}. Esto genera un estado de ansiedad importante en el donante, ya que para definir el diagnóstico con frecuencia es necesario realizar un seguimiento serológico o recurrir a técnicas moleculares.

Actualmente en Argentina existen muchos inconvenientes para realizar la confirmación del diagnóstico de infección por los retrovirus HTLV-1/2. Esto se debe a que hay una escasa disponibilidad de equipos de *Western blot* comerciales y a que los equipos que se encuentran disponibles tienen un precio muy elevado. Estudios previos realizados en nuestro país demostraron la utilidad de la IFI como una sencilla y robusta técnica alternativa para la confirmación de la infección por HTLV-1/2^{6,7,13,15}.

En este trabajo se demostró que el valor predictivo positivo utilizando diferentes metodologías de tamizaje es mayor al combinar el ELISA de Murex con la técnica de AP (88,5 % vs. 31,08 %, $p < 0,001$), con lo que disminuye significativamente el porcentaje de resultados falsos reactivos que surgen al utilizar solo la técnica de Murex. Además, se determinó que para un valor de RP de 4,74 por ELISA Murex, la sensibilidad del tamizaje es óptima, con una muy buena especificidad (98,04 %).

Por lo tanto, considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo, se propone modificar el algoritmo para definir el estatus serológico de HTLV-1/2 que se utiliza actualmente, ya que mediante la combinación de metodologías de tamizaje es posible disminuir el número de muestras que requieren ser confirmadas. Las muestras que resulten reactivas por ELISA Murex para HTLV con valores de RP comprendidos entre 0,97 y 4,74 serán retesteadas por duplicado por AP como técnica de tamizaje complementaria. Así, las

muestras que resulten no reactivas por AP serán consideradas con resultado final no reactivo, y no necesitarían ser confirmadas posteriormente. La técnica de AP tiene una alta sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra HTLV-1 y HTLV-2^{3,10,13}.

El algoritmo aquí propuesto no solo permitirá una más rápida definición del diagnóstico y la reducción del porcentaje de diagnósticos inconclusos, sino que también contribuirá a evitar el estado de ansiedad y angustia que se genera en el donante de sangre al citarlo para informarle acerca de un estado serológico indefinido y de la necesidad de hacer estudios continuados en el tiempo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Silvia Barzón por su asesoramiento en el análisis estadístico realizado en este trabajo.

Bibliografía

1. Abrams A, Akahata Y, Jacobson S. The prevalence and significance of HTLV-I/II sero indeterminate western blot patterns. *Viruses*. 2011;3:1320-31.
2. Andrade RG, Ribeiro MA, Namen-Lopes MS, Silva SM, Basques FV, Ribas JG, Carneiro-Proietti AB, Martins ML. Evaluation of the use of real-time PCR for human T cell lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43:111-5.
3. Berini CA, Susana Pascuccio M, Bautista CT, Gendler SA, Eirin ME, Rodríguez C, Pando MA, Biglione MM. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. *J Virol Methods*. 2008;147:322-7.
4. Césaire R, Bera O, Maier H, Lezin A, Martial J, Ouka M, Kerob-Bauchet B, Ould Amar AK, Vernant JC. Sero indeterminate patterns and sero conversions to human T-lymphotropic virus type I positivity in blood donors from Martinique, French West Indies. *Transfusion*. 1999;39:1145-9.
5. Gallego S, Recalde A, Gastaldello R, Isa M, Nates S, Medeot S. Kinetics study of human retrovirus antigens expression in T lymphocytic cell lines by indirect immunofluorescence assay. *Viral Immunology*. 1997;10:149-57.
6. Gastaldello R, Gallego S, Isa M, Nates S, Medeot S. Efficiency of indirect immunofluorescence assay as a confirmatory test for the diagnosis of human retrovirus infection (HIV-1 and HTLV-I/II) in different at risk populations. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1999;41:159-64.
7. Gastaldello R, Gallego S, Isa B, Maturano E, Sileoni S, Nates S, Medeot S. Immunofluorescence assay reactivity patterns of serum samples presenting indeterminate Western blot results for antibody to HIV-I and HTLV-I/II, Córdoba, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001;43:277-82.
8. Gastaldello R, Hall WW, Gallego S. Seroepidemiology of HTLV-I/II in Argentina: an overview. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;35:301-8.
9. Gessain A. Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases. *Bull Soc Pathol Exot*. 2011;104:167-80.
10. Llop N, Gastaldello R, Valle M, Macedo R, Maturano E, Blanco S, Medeot S, Gallego S. Evaluation of commercial equipment used in blood banks in Córdoba for the detection of anti-HTLV-I/II antibodies. *Rev Argent Microbiol*. 2000;32:202-5.
11. Mangano AM, Remesar M. del Pozo A, Sen L. Human T lymphotropic virus types I and II proviral sequences in Argentinian blood donors with indeterminate Western blot patterns. *J Med Virol*. 2004;74:323-7.
12. Martins ML, Santos AC, Namen-Lopes MS, Barbosa-Stancioli EF, Utsch DG, Carneiro-Proietti AB. Long-term serological follow-up of blood donors with an HTLV-indeterminate western blot: antibody profile of seroconverters and individuals with false reactions. *J Med Virol*. 2010;82:1746-53.
13. Medeot S, Nates S, Recalde A, Gallego S, Maturano E, Giordano M, Serra H, Reategui J, Cabezas C. Prevalence of antibody to human T cell lymphotropic virus types 1/2 among aboriginal groups inhabiting northern Argentina and the Amazon region of Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:623-9.
14. Murphy E. The clinical epidemiology of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996;13:215-9.
15. Otsuki K, Boia M, Gallego S, Iñiguez A, Vicente A. Identification of human T-lymphotropic virus by PCR and IFA techniques in seronegative individuals from Santa Isabel do Rio Negro, an isolated community in the Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39:60.