LA DETECCIÓN DE IgA PARA DIAGNOSTICAR LAS INFECCIONES RETROVÍRICAS EN EL CARIBE[1]

P. R. Ridel,[2] J. C. Artus[2] y A. Capron[3]

En la isla caribeña de Guadalupe, donde hay una alta prevalencia de infección por el virus linfotrópico T humano del tipo 1 (HTLV-I), los métodos de diagnóstico dan lugar a muchos resultados positivos falsos que hay que verificar mediante pruebas adicionales largas y costosas. En el presente artículo se describe una manera simple de solucionar este problema. Consiste, primero, en extraer del suero de un paciente toda la IgG y sus inmunocomplejos circulantes (ICC) mediante un tratamiento con proteína G, para después detectar la presencia de IgA antivírica en el suero tratado usando las pruebas comerciales de ELISA y Western blot con ligeras modificaciones.

En nuestra experiencia, la valoración de IgG con el ensayo inmunoenzimático (ELISA) para diagnosticar la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha dado resultados positivos falsos en alrededor de 5% de los sueros analizados. Además, la valoración de IgG con la técnica de Western blot suele producir bandas no específicas que son difíciles de clasificar y que requieren pruebas confirmatorias lentas y costosas.

Un factor que parece contribuir a la frecuencia de resultados positivos falsos en Guadalupe es que algunas personas sometidas a las pruebas de detección están infectadas por el virus linfotrópico T humano (HTLV) (retrovirus que causa la leucemia de células T en el hombre), cuya prevalencia en Guadalupe y otras islas del Caribe es alta. Se ha observado al respecto que de un grupo de personas cuyos resultados fueron positivos con la técnica de ELISA y negativos con la técnica de Western blot para la captación de IgG anti-VIH-1/2, 35 a 45% tuvieron resultados positivos en la valoración de IgG anti-HTLV-I con ambas técnicas.

El presente estudio se realizó para determinar si era factible, dadas las condiciones imperantes en Guadalupe, aumentar la especificidad antigénica del ELISA modificándolo, de la manera ya descrita por otros investigadores (*1*) para detectar la presencia de IgA en vez de IgG. A diferencia de esta última, la IgA y la IgM no atraviesan la barrera placentaria, de modo que ambas sirven para diagnosticar el SIDA congénito (*2*). Sin embargo, en estudios anteriores se ha demostrado que los anticuerpos de IgA anti-VIH persisten más tiempo que los de IgM, factor que nos indujo a elegir los primeros para realizar nuestros inmunoensayos y procurar resolver el problema de los resultados no específicos. Primero extrajimos toda la IgG de los sueros analizados con proteína G (*1, 3*). Posteriormente, con miras a ahorrar tiempo y di-

[1] Este trabajo fue subvencionado con fondos internos del Institut Pasteur, París, Francia. La versión en inglés, titulada "IgA testing for diagnosis of retroviral infections in the Caribbean", se publica en el *Bulletin of the Pan American Health Organization*, Vol 25, No. 3, 1991

[2] Institut Pasteur de la Guadeloupe, Pointe-à-Pitre. Dirección postal P.O. Box 484, 97142 Pointe-à-Pitre CEDEX, Francia, FWI

[3] Institut Pasteur de Lille, Centre de Biologie et d'Immunologie Parasitaire, Lille, Francia

nero, hicimos los inmunoensayos de tipo ELISA y Western blot elaborados para uso comercial, alterando un poco las indicaciones del fabricante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Para obtener las muestras de suero, se escogieron al azar 10 habitantes de Guadalupe que pertenecían a un grupo de seguimiento local en el Instituto Pasteur. Los 10 pacientes elegidos habían tenido resultados positivos en la valoración de IgG anti-VIH-1/2 con la técnica de ELISA (Rapid' ELAVIA Mixt, Diagnostic Pasteur, Marnes-la-Coquette, Francia) y todos, salvo dos, habían mostrado una o más bandas no específicas en el Western blot captor de IgG anti-VIH (New Lav-Blot I o II, Diagnostic Pasteur). Estos últimos (los pacientes 9 y 10) estaban coinfectados por el HTLV-I y el VIH-1.

Ninguno de los 10 sueros analizados dio un resultado positivo en los ensayos detectores de VIH-2 (Pepti Lav o New Lav-Blot II, Diagnostic Pasteur). En cambio, todos los sueros reaccionaron positivamente a la valoración de IgG anti-HTLV-I con la técnica de ELISA (Abbott, París, Francia) y mostraron las bandas específicas del HTLV-I (P19, 21 y 24) en el Western blot captor de IgG (DuPont de Nemours, París, Francia).

Muestras de sangre

Las muestras de sangre de los 10 pacientes se obtuvieron por punción venosa. Los sueros extraídos por decantación (2 horas a 25 °C) se conservaron a −20 °C hasta que se iniciaron los procedimientos descritos a continuación.

Extracción de IgG

Los anticuerpos de IgG, incluidos los que están presentes en autoanticuerpos o inmunocomplejos circulantes (ICC), suelen reducir la sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos captores de IgA. Por consiguiente, antes de valorar la presencia de IgA en los 10 sueros extraídos, se trataron con proteína G (3) para eliminar todas las subclases de IgG.

El tratamiento consistió en incubar los sueros con proteína G (en inglés *Protein G Sepharose*, producto elaborado por la compañía Pharmacia, Upsala, Suecia), modificando ligeramente el método descrito por Weiblen *et al.* (*1*). En resumen, se incubaron 25 µl de suero con 100 µl de una suspensión al 50% de proteína G agarosa en 0,02 mol/l de solución salina fosfatada a un pH de 7,6 y una temperatura de 37 °C, sometiendo esta mezcla a constante agitación durante 90 minutos. A continuación se diluyeron los sueros con el reactivo disolvente del estuche comercial[4] hasta obtener una concentración de 1:25 (para el Western blot) y otra de 1:50 (para la técnica de ELISA). La eficiencia de la extracción de IgG se determinó midiendo el grado de opacidad generado por un suero anti-IgG humana (Behring Diagnostic, Rueil-Malmaison, Francia).

ELISA

Los ELISA para la valoración de IgG anti-VIH-1/2 y anti-HTLV-I se realizaron según las indicaciones del fabricante,[4] con las siguientes modificaciones: 1) se preparó una dilución al 1:500 de un conjugado fosfatado de la porción $F(ab')_2$ de anti-IgA humana (Sigma, St. Louis, Estados Unidos de América); 2) el sustrato amortiguador fue 1 mol/l de dietanolamina (Sigma) compuesto de 0,5 mol/l de $MgCl_2$ (Sigma) y NaN_3 al 0,02% (Sigma), con

[4] Los fabricantes de estos estuches fueron los siguientes: ELISA detector de VIH-1/2, Pasteur Diagnostic; ELISA detector de HTLV-I, Abbott; Western blot detector de VIH, Pasteur Diagnostic; Western blot detector de HTLV-I, DuPont de Nemours.

suficiente HCl para obtener un pH de 9,8; 3) como agente cromogénico se usó 1 mg de P-nitrofenilfosfato por cada mililitro de sustrato amortiguador (2), y 4) después de incubar la mezcla 45 minutos a 37 °C, se determinó el grado de absorción con un filtro de 405 nm, usando como referencia un filtro de 620 nm.

Para hacer los cómputos e interpretar los resultados del ELISA se siguieron las instrucciones del folletín incluido en el estuche. Se designaron de positivos todos los resultados de la valoración de IgG e IgA que superaran en 10% o más el valor límite calculado (12-36% para el VIH-1 y 15-45% para el HTLV-I).

Western blot

Los Western blots captores de IgG anti-VIH-1 y anti-HTLV-I se hicieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (véase la nota 4 al pie de la página 13). Para valorar la presencia de IgA, se efectuaron inmunoblots usando el disolvente comercial para diluir los sueros tratados con proteína G hasta obtener una concentración de 1:25. En vez de la inmunoglobulina provista en el estuche se usó un suero anti-IgA humana marcado con fosfatasa (Sigma). El sustrato amortiguador se obtuvo mezclando 100 mmol/l de NaCl, 5 mmol/l de $MgCL_2$, y 100 mmol de TRIS con Cl, obteniéndose un pH de 9,5. El agente cromogénico fue una combinación de 66 µl de azul de tetrazolio al 5% (peso/volumen) (Sigma) y 33 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (Sigma) al 5% en 10 ml de sustrato amortiguador. Se incubaron los sueros durante dos horas a la temperatura del ambiente en una plataforma oscilante y el conjugado de anti-IgA humana y fosfatasa alcalina se incubó a la temperatura del ambiente durante una hora.

Resultados

Tratamiento con proteína G

Como se puede observar en el cuadro 1, el tratamiento con proteína G redujo la concentración de IgG en los sueros en 99,9% (de 12,0–21,7 mg/ml a 0,007–0,017 mg/ml).

ELISA

Antes del tratamiento con proteína G, todos los resultados de la valoración de IgG anti-VIH-1/2 y anti-HTLV-I con la técnica de ELISA fueron positivos, ya que los valores obtenidos fueron por lo menos 10% superiores al valor límite. Como se observa en el cuadro 1, estos valores fueron de 12 a 63% superiores al valor límite en el caso de la IgG anti-VIH-1/2, y de 15 a 54% en el de la IgG anti-HTLV-I.

Después de haberse tratado todos los sueros con proteína G, ninguno dio un resultado positivo en la valoración de IgG anti-VIH-1/2 y anti-HTLV-I con la técnica de ELISA. Todos los valores obtenidos fueron muy inferiores al valor límite. Los resultados de la determinación de IgG anti-VIH-1/2 fueron de 50 a 71% inferiores, y los de la determinación de IgG anti HTLV-I de 50 a 65%. Las excepciones fueron los casos 9 y 10, cuyos resultados fueron 27 y 38% inferiores al valor límite, respectivamente. La mayor parte de los valores se aproximaron a los obtenidos con las muestras de orientación proporcionadas en el estuche.

Todos los sueros, salvo los de los pacientes 9 y 10, dieron resultados negativos en la valoración de IgA anti-VIH-1/2 y anti-HTLV-I con la técnica de ELISA, mientras todos, sin excepción, dieron resultados negativos en la determinación de IgA anti-HTLV-I. En la mayor parte de los casos, la valoración de IgA anti-HTLV antes del tratamiento con proteína G dio un porcentaje superior al valor límite un poco más bajo que después del tratamiento con proteína G (véase el cuadro 1, columnas 6 y 9), pero las diferencias obser-

CUADRO 1. Detección de IgG, IgG anti-VIH-1/2, IgG anti-HTLV-I, IgA anti-VIH-1/2 e IgA anti-HTLV-I en el suero de 10 pacientes antes y después de la extracción de IgG mediante un tratamiento con proteína G. Los niveles de IgG obtenidos se indican en mg/ml, mientras que los de los anticuerpos dirigidos contra virus específicos se expresan en términos del porcentaje en que son superiores o inferiores al valor límite establecido

			Incremento o reducción en relación con el valor límite					
			IgG anti-VIH		IgG anti-HTLV			
Número del caso	IgG (mg/ml) Antes	IgG (mg/ml) Después	Antes (%)	Después (%)	Antes (%)	Después (%)	IgA anti-VIH (%)	IgA anti-HTLV (%)
1	21,7	0,009	+35	−70	+27	−52	−38	+24
2	12,4	0,010	+22	−51	+54	−51	−50	+27
3	SD	0,008	+33	−51	+40	−61	−53	+39
4	19,8	0,014	+30	−54	+18	−55	−46	+12
5	12,3	0,005	+14	−65	+16	−58	−33	+16
6	SD	0,014	SD	SD	+23	−65	−45	+16
7	18,4	0,017	+12	−50	+15	−50	−27	+13
8	SD	0,010	+24	−56	+23	−55	−48	+20
9	12,0	0,007	+63	−71	+32	−27	+44	+32
10	15,5	0,014	+55	−53	+17	−38	+27	+15

SD = Sin determinar

vadas con una muestra tan pequeña como la nuestra carecen de significación estadística.

A diferencia de los ocho sueros restantes, los sueros de los dos pacientes coinfectados (pacientes 9 y 10) dieron resultados 27 y 44% superiores al valor límite, respectivamente, en la determinación de IgA anti-VIH 1/2, lo cual demuestra que estos pacientes poseían una IgA anti-VIH-1/2 específica.

Western blot

Hemos observado que el tratamiento con proteína G suprimió por completo toda reactividad en el Western blot captor de IgG anti-VIH 1/2 y anti-HTLV-I. Por lo tanto, nuestros resultados confirman la eficacia del tratamiento con proteína G.

Como se indica en el cuadro 2, las bandas de IgG anti-VIH observadas en los ocho sueros con resultados positivos falsos (casos 1 a 8) desaparecieron por completo, lo cual demuestra que la reactividad observada con la IgG podría haber sido no específica.

Como se observó en el caso de la valoración de IgA anti-VIH 1/2 con la técnica de ELISA, los sueros de los dos pacientes coinfectados dieron resultados positivos cuando se sometieron a la técnica de Western blot captor de IgA anti-VIH-1/2. Algunas de las bandas detectadas al principio no se detectaron con los ensayos captores de IgA, pero las bandas principales (GP110, GP160 y P24/25) persistieron. Contrario a lo observado al valorarse la IgA anti-VIH, los 10 sueros dieron resultados positivos en la valoración de IgA anti-HTLV-I y mostraron todas, o por lo menos muchas, de las bandas específicas detectadas previamente.

Discusión y conclusiones

Nuestros hallazgos indican claramente que la presencia de una IgG anti-VIH-1/2 no específica produjo los resultados positivos falsos en la valoración de IgG anti-VIH-1/2 con la técnica de ELISA.

Ya que todos los pacientes del estudio estaban infectados por el HTLV-I, y dado

CUADRO 2. Valores obtenidos al analizar 10 sueros con la técnica de Western blot. Se indican las bandas de IgG anti-VIH-1/2 y de IgG anti-HTLV-I detectadas antes del tratamiento con proteína G y las bandas de IgG e IgA observadas después del tratamiento

	Western blot detector de VIH 1/2			Western blot detector de HTLV-I		
Número del caso	IgG Antes	IgG Después	IgA Después	IgG Antes	IgG Después	IgA Después
1	P24/25	SBV	SBV	P19, 21, 24, 28, GP46	SBV	P19, 21, 24, 40, GP46
2	P24/25	SBV	SBV	P19, 21, 24, 28, 42, 53	SBV	P19, 21, 24, 28, 53
3	P24/25	SBV	SBV	P19, 21, 24, 26, 42, 53, GP46	SBV	P19, 21, 24, 26, 42, 53, GP46
4	P24/25	SBV	SBV	P19, 21, 24, 26, 32, GP46	SBV	P19, 21, 24, 26, GP46
5	P55	SBV	SBV	P19, 21, 24, 26, 28, 32, 42, 53, GP46	SBV	P19, 21, 24, 26, 32, 42, GP46
6	P55	SBV	SBV	P19, 21, 24, 40x, 53, GP46	SBV	P19, 21, 24, 53, GP46
7	P18,55	SBV	SBV	P19, 21, 24, 28, 32, 42, 53, GP46	SBV	P19, 21, 24, 28, 32, 42, 53, GP46
8	P18,52	SBV	SBV	P19, 21, 24, 32, 40x, 53, GP46	SBV	P19, 21, 24, 40x, 53, GP46
9	GP160	SBV	GP160	P19, 21, 24, 28, 32, 42, 53, GP46	SBV	P19, 21, 24, 26, 28, 53, GP46
	GP110	"	GP110			
	P68	"	SBV			
	P55	"	P55			
	P52	"	SBV			
	P40	"	P40			
	P24/25	"	P25/25			
	P18	"	P18			
10	GP160	"	GP160	P19, 21, 24, 28, 40x, 53, GP46	SBV	P19, 21, 24, GP18, 40, 41
	GP110	"	GP110			
	P68	"	SBV			
	P55	"	P55			
	P52	"	SBV			
	GP41	"	GP41			
	P40	"	P40			
	P24/25	"	P24/25			
	P18	"	P18			

SBV = Sin bandas visibles

que el VIH y el HTLV producen una reacción cruzada, es muy probable que algunos de los resultados positivos falsos en el ELISA captor de IgG anti-VIH-1/2 hayan obedecido a anticuerpos dirigidos contra un componente antigénico del HTLV-I. Esto es difícil de comprobar, puesto que la eliminación total de anticuerpos dirigidos específicamente contra el HTLV-I se consigue únicamente con cantidades abundantes de antígenos derivados del HTLV-I y porque, como han señalado otros investigadores, los ICC y muchos tipos de au-

toanticuerpos pueden dar origen a resultados no específicos (*4, 5*).

Pese a lo anterior, cuando se extrajo toda la IgG mediante el tratamiento con proteína G estreptocócica, a la que se acoplan todas las subclases de IgG (*3*) (incluidos los ICC), nos fue posible detectar la presencia de IgA. Al analizarse los sueros con el ELISA captor de IgA anti-VIH-1/2, desaparecieron todos los resultados positivos falsos. Esto indica que nuestra técnica es más específica que la que depende de la detección de IgG. Debe recordarse, sin embargo, que cualquier método basado en la detección de IgA es útil solamente después de extraer la IgG. (Cuando analizamos los sueros por primera vez para valorar la IgA antes del tratamiento con proteína G, encontramos que 45% tuvieron resultados positivos en la valoración de IgA anti-VIH 1/2 y anti-VTLH-I con la técnica de ELISA).

En lo que respecta a los resultados de Western blot, en 8 de los 10 sueros analizados nunca se detectaron las bandas específicas del VIH. No obstante, nuestros resultados demostraron claramente que el uso combinado de un tratamiento preliminar con proteína G y la técnica de ELISA para valorar la presencia de IgA representa un método de detección rápido y económicamente ventajoso que elimina la necesidad de hacer pruebas confirmatorias. Además, el Western blot captor de IgA reveló las bandas específicas del HTLV-I en los 10 sueros, así como las bandas específicas del VIH-1, claramente discernibles, en los dos casos de coinfección. Todo esto indica que la IgA es tan útil como la IgG, o más, para confirmar la presencia de una infección retrovírica.

En general, la presencia de anticuerpos de IgM e IgA es indicadora de una infección reciente, aunque la IgA anti-VIH tarda más en desaparecer que la IgM. Las IgA, que al igual que las IgM no atraviesan la barrera placentaria, son más útiles que estas para diagnosticar las infecciones adquiridas *intra utero*, como la toxoplasmosis (*6*), las infecciones por citomegalovirus (*7*) y el SIDA (*2*). Hasta ahora, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que la IgA anti-VIH-1 aparece un poco antes que la IgG anti-VIH-1. En un caso en particular, se encontró que un paciente con un resultado positivo en la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*) para la detección de los antígenos *gag* y *pol* del VIH-1 tenía un resultado negativo en el ELISA captor de IgG anti-VIH-1/2 y uno positivo en el ELISA captor de IgA anti-VIH-1/2 (datos inéditos).

La modificación de las instrucciones que vienen en los estuches comerciales permite el desarrollo de un método simple y barato de detectar la presencia de IgA anti-VIH. En el Caribe, donde se notifica una alta prevalencia de infección por el HTLV-I (hasta 13% en algunos países), el porcentaje de resultados positivos falsos en la valoración de IgG anti-VIH con la técnica de ELISA es relativamente alto. Nuestros resultados revelan claramente que el reemplazar la técnica del ELISA captor de IgG anti-VIH con la de ELISA captor de IgA anti-VIH, cuya especificidad es mayor, redundaría en un ahorro temporal y monetario y permitiría una cobertura más amplia de la población con inmunoensayos detectores de anticuerpos contra el HTLV. No obstante, también se recomienda que la metodología aquí descrita se aplique en otros países del Caribe con el fin de confirmar los resultados preliminares obtenidos en este estudio.

Agradecimiento

Los autores agradecen a Mirette Chalcou y a Marie-France Gamblin su apoyo técnico y secretarial, respectivamente, y a Régis Goursaud el proporcionamiento de los sueros.

REFERENCIAS

1. Weiblen BJ, Schumacher RT, Hoff R. Detection of IgM and IgA HIV antibodies after removal of IgG with recombinant protein G. *J Immunol Methods*. 1990;126:199–204.

2. Jendis JB, et al Evaluation of diagnostic tests for HIV infection in infants born to HIV-infected mothers in Switzerland. *AIDS*. 1988;2:273–279.

3. Bjorck L, Kronvall G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol*. 1984;133:969–974.

4. Euler HH, Kern P, Löffler H, Dietrich M. Precipitable immune complexes in healthy homosexual men with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Exp Immunol*. 1985;59:267–275.

5. Lane HC, Fauci AS. Immunological abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Rev Immunol*. 1985;3:477–500.

6. Decoster A, Caron A, Darcy F, Capron A. IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet*. 1988;ii:1104–1107.

7. Stagno S, Pass RF, Reynolds DW, Moore MA, Nahmias AJ, Alford CA. Comparative study of the diagnostic procedures for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics*. 1980;62:251–260.

SUMMARY

IgA TESTING FOR DIAGNOSIS OF RETROVIRAL INFECTIONS IN THE CARIBBEAN

In Guadaloupe, a Caribbean island with a high prevalence of HTLV-I infected subjects, diagnostic methods give a high percentage of false positive results for HIV IgG that demand additional time and expense for confirmatory tests. This article describes a simple way of overcoming this problem. First, all IgG and IgG immune complexes are removed by protein G treatment, and then IgA enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the Western blot test are performed with minor modification of commercially available kits.