

PROCEDIMIENTO SENCILLO PARA OBTENER GRANDES CANTIDADES DE ANTIGENOS DEL VIH PARA SERODIAGNOSTICO¹

Jairo Ivo-dos-Santos² y Bernardo Galvão-Castro²

INTRODUCCION

Se han desarrollado varias pruebas para detectar anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). De estos, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (1) y la prueba de inmunoelectrotransferencia de Western (2, 3) son los métodos de elección para el análisis serológico y la confirmación de la seropositividad, respectivamente. En casi todos estos ensayos se utilizan antígenos víricos que se purifican mediante centrifugación por gradientes de densidad de sacarosa (4, 5) o se obtienen mediante técnicas de ingeniería genética (6, 7). La consiguiente necesidad de disponer de equipo y reactivos costosos, como ultracentrifugadoras y pruebas aprobadas de inmunoelectrotransferencia de Western, impide la práctica regular del ensayo con-

firatorio del VIH en los laboratorios carentes de recursos. En este documento se indican los resultados de un esfuerzo hecho por encontrar una forma más sencilla, barata y rápida de obtener antígenos víricos apropiados para la confirmación serológica de la infección por el VIH.

MATERIALES Y METODOS

Siguiendo el método descrito por otros investigadores (8), se cultivó una línea celular H9 de linfoblastos infectada por el VIH-1 en estado de replicación productiva, suministrada por el Dr. R. C. Gallo, del Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, MD, Estados Unidos de América. El medio de cultivo (RPMI 1640 más suero fetal de ternero al 10%, 2 mM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycinina) se cambió cada tres o cuatro días.

Purificación del virus

Para purificar el virus se siguió un protocolo de centrifugación diferencial. Las células infectadas (10^6 /ml) se centrifugaron a baja velocidad (200 g

¹ El trabajo aquí resumido se realizó con fondos de una subvención (no. 10/0212-7) de la Fundación Banco del Brasil.

² Fundación Oswaldo Cruz, Departamento de Inmunología, Centro Colaborador de la OMS para el SIDA. Dirección postal: Avenida Brasil 4365, CEP 21040, Rio de Janeiro, Brasil.

durante 10 minutos a 4 °C). El sobrenadante se centrifugó a 5 000 g durante 30 minutos y a 4 °C para retirar los desechos celulares, y los virus que contenía se concentraron centrifugándolos a 41 000 g durante 2 horas a 4 °C. Para ello se utilizó una centrifugadora Beckman J2-21 con un rotor JA 21. El líquido sobrenadante se retiró con cuidado y una cantidad equivalente a una quingentésima parte ($1/500$) del volumen inicial del concentrado vírico se volvió a suspender en una solución 0,01 M de tris(hidroximetil) aminometano (TRIS), 0,15 M de NaCl y detergente no iónico Triton-X-100 al 0,25 % con un pH de 7,2. La concentración proteínica se determinó mediante la técnica de Lowry (9) y las suspensiones víricas se mantuvieron a -70 °C hasta el momento de su empleo.

Prueba de inmunoelectrotransferencia de Western

Se separó una muestra de antígeno del VIH semipurificado en sulfato dodecílico sódico (SDS) y 2-mercaptoetanol y se sometió a electroforesis de SDS-gel en un gel de acrilamida al 10%. Las bandas de proteína resultantes se trasladaron luego a papel de nitrocelulosa (Schleicher y Schuel, Dassel, República Federal de Alemania) en un aparato de transferencia (BioRad Laboratories, Richmond, VA, EUA) a 40 voltios durante 14 a 16 horas. Se empleó metanol al 20% diluido en una solución 0,025 M de TRIS y 0,192 M de glicina como amortiguador de transferencia. Se neutralizó el papel de nitrocelulosa (es decir, se inactivaron las zonas de enlace para proteína que quedaban libres) en Tween (polisorbato) 20 al 0,3% y una solución salina amortiguada con fosfato (SAF) (pH 7,2), con leche en polvo descremada al 5% durante 60 minutos. Las bandas se incubaron luego con mues-

tras de suero diluidas al 1:100 en la misma solución amortiguada durante 60 minutos. Todas las operaciones de incubación y lavado (en SAF y en Tween 20 al 0,3%) se realizaron a temperatura ambiente.

Las bandas se incubaron ulteriormente con IgG antihumana de cabra, marcada con peroxidasa de rábano picante, diluida al 1:1 000 en una solución supresora durante 60 minutos. Después del lavado, las bandas se incubaron con un sustrato cromógeno de diaminobencidina (0,25 mg/ml), solución amortiguada con citrato-fosfato (pH 5,0) y H₂O₂ al 0,001%. La reacción se interrumpió mediante inmersión de las bandas en agua destilada.

Para efectos de comparación, se realizó la prueba comercial de inmunoelectrotransferencia de Western (Du Pont Company, Wilmington, DE, EUA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Muestras de suero

Se obtuvieron muestras de suero de 85 pacientes. De ellos, 21 tenían el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA); 17, el complejo relacionado con el SIDA (CRS); 27, linfadenopatía generalizada persistente (LGP); y 20, infecciones asintomáticas causadas por el VIH. Los criterios clínicos empleados para evaluar el estado clínico de los casos de SIDA, CRS y LGP fueron los de los Centros para el Control de Enfermedades, de los Estados Unidos de América (10). Las muestras de suero fueron positivas a las pruebas comerciales ELISA (1), de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y de inmunoelectrotransferencia de Western. Se incluyeron como testigos ne-

gativos muestras de suero de seis personas sanas que no presentaban signos de infección por el VIH.

RESULTADOS

El rendimiento normal del procedimiento de semidepuración fue de alrededor de 100–120 μg de proteína total por cada 50 ml de líquido sobrenadante que contenía células infectadas. Aunque los concentrados víricos estaban contaminados con proteínas del medio de cultivo de origen celular, como lo indicó la coloración con rojo Ponceau de los antígenos trasladados al papel de nitrocelulosa (se han omitido los datos correspondientes), estos contaminantes no obstaculizaron la inmunocoloración de las proteínas víricas. Sin embargo, a causa de su presencia, no se determinó la cantidad real de proteína vírica que contenía el concentrado.

En general, se puede decir que los resultados obtenidos con la prueba "casera" de inmunoelectrotransferencia de Western son bastante similares a los de la prueba comercial (figura 1). Sin embargo, se observaron algunas diferencias en la intensidad de la reactividad a los antígenos *gag* p55, *env* gp120 y gp160. Algunos sueros de enfermos de SIDA que no reaccionaron con el antígeno p55 del estuche comercial reaccionaron con el p55 de la prueba de inmunoelectrotransferencia de Western "casera" (cuadro 1). Por otra parte, con la prueba comercial se observó constantemente una reacción con los antígenos gp160 en todos los sueros apropiados, que no fue observada al emplear los antígenos semipurificados.

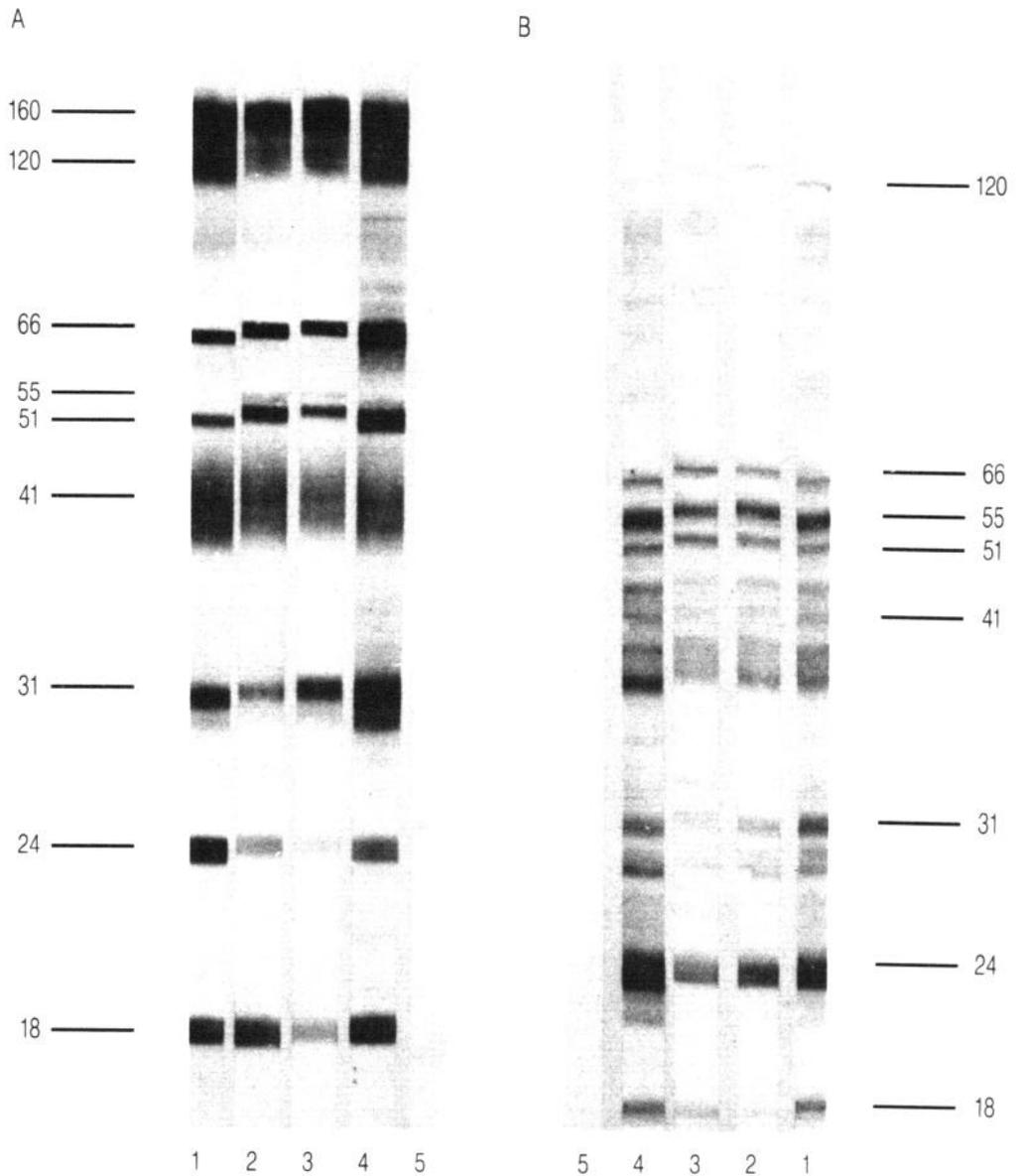
Durante el transcurso de este trabajo se comprobó que era necesario mantener el porcentaje de células que expresaban el virus en más de 90% para evitar que apareciera un fondo apreciable. En el extremo opuesto, cuando se obtuvo el virus de un cultivo en el que solo 30% de las células expresaban el virus (según pudo comprobarse con la prueba de IFI), el rendimiento fue tan bajo que fue imposible realizar un ensayo adecuado (se han omitido los datos correspondientes).

DISCUSION

En los últimos tres años las pruebas de detección de anticuerpos contra el VIH han transformado la idea que se tenía sobre la epidemiología del SIDA y la infección por este virus. El punto de partida fue el descubrimiento de líneas celulares apropiadas como huéspedes para la proliferación del virus (8). Esto permitió establecer procedimientos serológicos para la detección y el diagnóstico confirmatorio. Sin embargo, los costos de las pruebas de confirmación como la de inmunoelectrotransferencia de Western son tan elevados que impiden su empleo regular en países que carecen de los recursos necesarios.

Los datos aquí presentados indican que se podría emplear una metodología más barata y sencilla para obtener una cantidad suficiente de antígenos víricos para emplearlos en la prueba confirmatoria de inmunoelectrotransferencia de Western. No obstante, se han observado algunas diferencias entre los resultados obtenidos con la prueba "casera" de inmunoelectrotransferencia de Western y el producto comercial. En particular, no fue posible encontrar la *env* gp160, una importante proteína vírica. Esto podría explicarse por la pér-

FIGURA 1. Fotografías que muestran la reactividad de anticuerpos IgG frente a los antígenos del VIH-1 electrotransferidos a tiras de nitrocelulosa de (A) la prueba de inmunoelectrotransferencia de Western y (B) de nuestra prueba "casera" de este mismo tipo (7 μ g de proteína por banda). Las bandas numeradas se probaron con suero de enfermos con SIDA (1), el complejo relacionado con el SIDA (2), linfadenopatía generalizada persistente (3) e infecciones asintomáticas causadas por el VIH (4) así como con suero humano normal (5). Los números a la izquierda y derecha representan el peso molecular (daltones $\times 10^{-3}$)



dida parcial de las proteínas de la envoltura durante la centrifugación "casera" de los antígenos (12). Por otra parte, nuestras preparaciones parecen contener concentraciones más elevadas de *gag* p55 porque algunos sueros de enfermos de SIDA que no reaccionaron con la *gag* p55 en la prueba comercial, lo hicieron al someterlos al ensayo con nuestra preparación de antígenos.

Respecto de la conveniencia de este método de preparación de antígenos, cabe señalar que los resultados obtenidos con todos los sueros positivos sometidos a ensayo, que representan una amplia gama de formas clínicas de la infección por el VIH, se deter-

CUADRO 1. Comparación de los resultados obtenidos con la prueba "casera" de inmunoelectrotransferencia de Western y con la prueba comercial (DuPont). Aparte de los testigos negativos (omitidos), los sueros probados eran de pacientes con SIDA, el complejo relacionado con el SIDA (CRS), linfadenopatía generalizada persistente (LGP) e infecciones asintomáticas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

Banda	Prueba	SIDA (n=21)		CRS (n=17)		LGP (n=27)		VIH (n=20)	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
gp ^a 160	"Casera"	0	0	0	0	0	0	0	0
	Comercial	20	95	17	100	27	100	20	100
gp120	"Casera"	9	43	16	94	27	100	13	65
	Comercial	20	95	17	100	27	100	19	95
p ^b 66	"Casera"	20	95	17	100	27	100	20	100
	Comercial	21	100	16	94	27	100	20	100
p55	"Casera"	17	81	15	88	25	93	20	100
	Comercial	4	19	10	59	11	41	13	65
p51	"Casera"	18	86	17	100	27	100	20	100
	Comercial	17	81	15	88	27	100	20	100
gp41	"Casera"	21	100	15	88	27	100	18	90
	Comercial	20	95	15	88	27	100	16	80
p31	"Casera"	18	86	15	88	26	96	16	80
	Comercial	18	86	14	82	26	96	15	75
p24	"Casera"	12	57	15	88	24	89	19	95
	Comercial	17	81	17	100	26	96	19	95
p18	"Casera"	9	43	13	76	22	81	13	65
	Comercial	15	71	8	47	22	81	16	80

^a gp = glucoproteína.

^b p = proteína.

minaron teniendo en cuenta los requisitos de positividad de la prueba de inmunoelectrotransferencia de Western fijados por la Organización Mundial de la Salud; es decir, que las inmunoglobulinas de cada suero sometido a ensayo reaccionen al menos con un polipéptido de cada uno de los tres genes estructurales (*env*, *gag* y *pol*) (13). Por otra parte, con el fin de proporcionar una evaluación completa de la especificidad de la prueba "casera" de inmunoelectrotransferencia

de Western y también de la prueba comercial, convendría ensayar sueros de sujetos con infecciones endémicas locales tales como la enfermedad de Chagas, leishmaniasis y malaria, porque estas enfermedades causan trastornos inmunitarios que podrían falsear los inmunoensayos.

En general, los resultados logrados con los antígenos semipurificados obtenidos por simple centrifugación diferencial indican que tales antígenos se pueden utilizar para realizar la prueba de inmunoelectrotransferencia de Western. Por tanto, parece que este sencillo método de obtención de antígenos del VIH puede ser una buena opción para los laboratorios cuyos recursos son insuficientes para comprar equipo y reactivos costosos.

RESUMEN

El método establecido para la purificación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) implica la centrifugación por gradientes de densidad de sacarosa de lisados de células infectadas. Se ha desarrollado otra metodología para purificar grandes cantidades de antígenos del VIH que evita la necesidad de tener un equipo costoso, como ultracentrifugadoras, y de fijar un gradiente para la purificación. Estos antígenos semipurificados se han empleado para realizar una prueba "casera" confirmatoria de inmunoelectrotransferencia de Western que produjo resultados comparables a los obtenidos con la prueba comercial (Du Pont). Aunque el procedimiento "casero" no permitió detectar una importante proteína vírica (*env* gp160), este método de purificación parece ofrecer una forma apropiada y económica de obtener antígenos para confirmar la presencia de anticuerpos contra el VIH. □

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Sr. Genilto Vieira por el trabajo fotográfico y a la Dra. Vera Bongertz por la revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

- 1 Weiss, S. H., Goedert, J. J., Sarnaghadaran, M. G. y Bodner, A. J. Screening test for HTLV-III (AIDS agent) antibodies: Specificity, sensitivity and applications. *JAMA* 253:221-22, 1985.
- 2 Schupbach, J., Popovic, M., Gilden, R. V., Gonda, M. A., Sarnaghadaran, M. G. y Gallo, R. C. Serological analysis of a subgroup of hu-

- man T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) in Swiss patients with AIDS. *Science* 224:503-505, 1984.
- 3 Ulstrup, J. C., Skjoug, J. C., Figenshau, J., Orstavic, J., Bruun, N. y Petersen, G. Sensitivity of Western blotting compared with ELISA and immunofluorescence during seroconversion after HTLV-III infection. *Lancet* 1:1151-1152, 1986.
- 4 Sarnaghadaran, M. G., Popovic, M., Brush, L., Schupbach, J. y Gallo, R. C. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* 224:503-505, 1984.
- 5 Gallo, D., Diggs, J. L., Shell, G. R., Dailey, P. J., Hoffman, M. N. y Riggs, J. L. Comparison of detection of antibody to the acquired immunodeficiency syndrome virus by enzyme immunoassay, immunofluorescence, and Western blot methods. *J Clin Microbiol* 23:1049-1051, 1986.
- 6 Steimer, K. S., Higgins, K. W., Powers, M. A. et al. Recombinant polypeptide from the endonuclease region of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus polymerase (*pol*) gene detects serum antibodies in most infected individuals. *J Virol* 58:9-16, 1986.
- 7 Dawson, G. J., Heller, J. S., Wood, C. A. et al. Reliable detection of individuals seropositive for the human immunodeficiency virus (HIV) by competitive immunoassays using *Escherichia coli*-expressed HIV structural proteins. *J Infect Dis* 157:149-155, 1988.
- 8 Popovic, M., Sarnaghadaran, M. G., Read, E. y Gallo, R. C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500, 1984.
- 9 Lowry, D. H., Rosebrough, N. J., Faar, A. L. y Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
- 10 Centros para el Control de Enfermedades. Classification system for human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus infection. *MMWR* 35:334-339, 1986.

- 11 Sandstrom, E. G., Schooley, R. T., Ho, D. D. *et al.* Detection of human anti-HTLV-III antibodies by indirect immunofluorescence using fixed cells. *Transfusion* 25:308-310, 1985.
- 12 Megrath, M., Witte, O., Pincus, T. y Weismann, I. L. Retrovirus purification: method that conserves envelope glycoprotein and maximizes infectivity. *J Virol* 25:923-927, 1978.
- 13 Organización Panamericana de la Salud. Report of the Meeting on Guidelines for Evaluation and Standardization of HIV Antibody Kits. Washington, DC, 2 a 3 de diciembre de 1987.

SUMMARY

A SIMPLE PROCEDURE FOR OBTAINING LARGE AMOUNTS OF HIV ANTIGENS FOR SERODIAGNOSTIC PURPOSES

The established method of purifying human immunodeficiency virus (HIV) involves centrifuging the lysates of infected cells onto a sucrose gradient. We have developed an alternative methodology for purifying large amounts of HIV antigens that avoids the need for expensive equipment such as an

ultracentrifuge and requires no purification gradient. These semipurified antigens have been used to perform a "homemade" confirmatory Western blot assay that produced results comparable to those obtained with a commercial (Du Pont) Western blot assay. Although the "homemade" procedure did not detect one important viral protein (*env* gp160), this purification method seems to offer a suitable and economical way of obtaining antigens to confirm the presence of HIV antibodies.