

Kit de western blot de bajo costo hecho en Perú revela buen rendimiento diagnóstico para la confirmación de HTLV

Miranda-Ulloa E¹, Romero-Ruiz S¹, Amorín-Uscata B¹; Briceño-Espinoza R¹; Orellana-Díaz O²; Montalvo-Otivo R², Asmat-Marrufo P³, Fernández-Gómez V³.

¹ Laboratorio de Referencia Nacional de Virus de Transmisión Sexual VIH/SIDA, Instituto Nacional de Salud, Lima; ² Dirección Regional de Salud Junín, Junín; ³ Gerencia Regional de Salud La Libertad, La Libertad, Perú.

Email: fernandoul@hotmail.com; emiranda@ins.gob.pe

RESUMEN

El virus linfotrópico de las células T del humano (HTLV), es endémico en el Perú y desarrolla enfermedades severas: linfomas no Hodgkin (tipo de leucemia), paraparesia espástica, dermatitis infectiva e hiperinfección por Strongyloides. En el Perú, anualmente se gasta en la compra de Kits comerciales de confirmación medio millón de dólares (costo Kit de Western Blot o Inmunoblot: 1200 dólares/18 determinaciones). El objetivo fue desarrollar un kit in house de Western blot de bajo costo para la confirmación de HTLV. Se realizó un estudio descriptivo transversal de evaluación de prueba diagnóstica (2015-2016), previa aprobación por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de salud. Se empleó 100 sueros; 50 positivos a HTLV y 50 negativos a HTLV (Inmunoblot comercial: Prueba de Referencia). Para obtener el antígeno se sonicó células MT2 infectadas con HTLV-1. Las proteínas obtenidas, fueron cuantificadas por Bradford y evaluadas en poliacrilamida. Luego el antígeno fue electrotransferido hacia la nitrocelulosa. Los ensayos fueron realizados usando anti IgG humano conjugado con peroxidasa. Se usó las directrices Internacionales para la interpretación de resultados. Finalmente, se evaluó los parámetros de reactividad. Sensibilidad: 94,0 %; Especificidad 98,0 %; Valor predictivo positivo: 97,9 %; Valor predictivo negativo: 94,2 %. Se obtuvo cuatro indeterminados y no se apreció ningún falso positivo ni falso negativo. La repetibilidad intralaboratorio y la reproducibilidad evaluada en costa, sierra y selva mostró un 100 % de concordancia cualitativa.

El kit de Western blot con tecnología propia desarrollada en Perú ha demostrado buen rendimiento diagnóstico para la confirmación de HTLV. El costo por prueba sería aproximadamente de sólo 10 dólares, siete veces menor que la prueba comercial. Recomendamos incorporar el kit en el Perú para reducir significativamente los costos de diagnóstico.

Palabras clave: western blot, HTLV, inmunoblot, sensibilidad, especificidad.

INTRODUCCIÓN

El virus linfotrópico de las células T del humano tipo I (HTLV-1), es un retrovirus endémico en el Perú a diferencia del HTLV-2 que es infrecuente. El HTLV-1 se transmite por relaciones sexuales, contacto con sangre y lactancia materna. Su replicación lo realiza en los linfocitos CD4, desencadenando enfermedades severas: Linfomas no Hodgkin, Paraparesia espástica tropical, dermatitis infectiva infantil, e hiperinfección por *Strongyloides stercoralis*.^{1,2}

Los bancos de sangre de nuestro país, realizan el tamizaje de todas las unidades sanguíneas con los siete marcadores serológicos: sífilis, Hepatitis B (Antígeno de transmisión).³

Una de las vías de infección que preocupa es la transmisión vertical del HTLV-1, sobre todo a través de la lactancia materna. Al no contar con una Norma Técnica para el diagnóstico y manejo del paciente con HTLV no se realiza el tamizaje obligatorio del HTLV en el control prenatal; generándose como consecuencia nuevos niños infectados, que muchos de ellos en la adolescencia o en la edad adulta, presentarán dificultad para caminar y se esclavizarán al uso de sillas de ruedas o muletas.²

Para el diagnóstico serológico confirmatorio, la prueba con mayor fiabilidad es el Inmunoblot o Western blot; Estados Unidos, Cuba y Bélgica se encuentran entre los países fabricantes de kits comerciales, cuyos costos son elevados: kit para 18 determinaciones/1200 dólares, generando un problema presupuestal la adquisición de estos reactivos de importación.^{4,5}

Con la idea de aportar en la accesibilidad del diagnóstico a un bajo costo y que ayude en el desarrollo de una Norma Técnica en Perú, nos propusimos los siguientes objetivos:

OBJETIVO

General: Desarrollar un kit in house de Western blot de bajo costo para la confirmación de HTLV.

Específicos:

- 1) Estandarizar la prueba de western blot usando antígenos obtenidos de células infectadas con HTLV-1.
- 2) Determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica de western blot frente a muestras peruanas negativas y positivas a HTLV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio: El diseño es transversal prospectivo de evaluación de pruebas diagnósticas. El estudio se realizó durante los años 2015–2016 y fue aprobado previamente por el Comité del Ética del Instituto Nacional de Salud.

La investigación se desarrolló en cuatro etapas: selección de sueros humanos empleados, preparación de los cultivos celulares, estandarización de la técnica de western blot y determinación de la eficiencia diagnóstica.

Sueros humanos empleados: Se seleccionaron por conveniencia un total de 100 muestras de sueros que estuvieron distribuidos en 2 paneles:

Panel A: 50 sueros positivos a HTLV-1, confirmados y diferenciados por Inmunoblot (prueba de referencia)⁴. Estos sueros seleccionados fueron VIH negativos.

Panel B: 50 sueros negativos a HTLV-1/2: 5 con sífilis, 5 de gestantes, 5 con enfermedad reumatoide, 5 con hepatitis B, 5 con VIH y 25 de aparentemente sanos.

Preparación de los cultivos celulares: Se cultivó la línea celular MT2, células T humanas transformadas por cocultivos con linfocitos de leucemia crónicamente infectadas con el virus del HTLV-1.

Estas células fueron cultivadas en frascos de 25 cm², conteniendo medio de cultivo RPMI 90 % suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 100 µL de glutamina y 100 µL de HEPES. Las células fueron incubadas en una estufa de CO₂ al 5 % y a 37°C, por 4 a 5 días.

Los cultivos celulares fueron homogenizados y luego transferidos a un tubo de centrifuga de 15 ml cada uno, se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y separó el sedimento celular (pellet).

Estandarización de la técnica de western blot: Sonicación de las células infectadas con HTLV-1: El pellet fue homogeneizado en solución salina y sonicado a 60 decibels por un total de 6 minutos. Posteriormente se realizó la cuantificación protéica antigénica por el método de Bradford.

Preparación de las tiras Blot: La separación de las proteínas antigénicas de los antígenos en estudio fue realizada siguiendo la metodología descrita por Tsang et al. (1983-1986), El equipo que se utilizó fue un sistema vertical (Mini-Protean II Electroforesis cel, Bio-rad).

Detección Inmunoenzimática: Las tiras de nitrocelulosa se incubaron en PBS/Tween-20-leche conteniendo los sueros en estudio, a la dilución 1/40. El volumen de la muestra diluida por canal de la placa de incubación fue de 1 ml. Las tiras se incubaron a temperatura ambiente por tres horas.

Luego se lavaron por 5 veces con PBS/Tween-20 y posteriormente se incubaron en agitación constante por una hora con conjugado (Anti IgG ligada a una peroxidasa), a la dilución de 1/1000 en PBS/Tween-20-leche.

Para visualizar las bandas antigénicas, las tiras fueron incubadas en solución de sustrato (peróxido de hidrógeno 0.01% y diaminobencidina a 0.5 mg/ml en PBS pH 7.2) por espacio de 5 a 10 minutos, hasta la aparición del color de las bandas. Las tiras se lavaron 5 veces con agua destilada para detener la reacción y eliminar el sustrato.

RESULTADOS

Interpretación: Para el criterio de positividad se usó la referencia de la OMS.

Seronegativa: Sin reactividad a las proteínas específicas del HTLV

Seropositiva para HTLV:

1. Reactividad a GAG (p19 con o sin p24) y dos de ENV (gp21 y gp46)
2. Reactividad a GAG (p24 con o sin p19) y dos de ENV (gp21 y gp46)
3. Reactividad a GAG (p19 y p24) y ENV(gp21)

Indeterminado: Se detectan bandas específicas para HTLV, pero el patrón no cumple los criterios de seropositividad para HTLV.

Determinación de la eficiencia diagnóstica: Se elaboró una tabla de contingencia de dos por dos para el cálculo de la sensibilidad y especificidad, utilizando el programa Epidat v3.1 y Excel.

Tabla. Resultados de la técnica de Western blot, frente a 100 sueros: 50 positivos a HTLV-1 y 50 negativos a HTLV-1/2

Enfermedad	Total	Positivo	Negativo	Indeterminado
HTLV-1	50	47	0	3
Sífilis	5	0	5	0
VIH	5	0	4	1
Hepatitis B	5	0	5	0
Enfermedad reumatoide	5	0	5	0
Gestantes	5	0	5	0
Aparentemente sanos	25	0	25	0
Total	100	47	49	4

Los parámetros evaluados fueron calculados usando un Intervalo de confianza al 95 % siendo sus resultados los siguientes: Sensibilidad: 94,0 % (82,4 - 98,4 %); Especificidad 98,0 % (88,0 - 99,9 %); Valor predictivo positivo: 97,9 % (87,5 - 99,9 %); Valor predictivo negativo: 94,2 % (83,0 - 98,5 %).

CONCLUSIONES

- ✓ La prueba de Westen Blot desarrollada en Perú para el diagnóstico de HTLV, no presentó ningún falso positivo ni falso negativo al ser enfrentados a los sueros referentes del estudio.
- ✓ En consecuencia, la prueba de western blot in house confirma la infección por HTLV debido a que esta prueba evidencia cualitativamente por separado los anticuerpos contra las bandas de los antígenos específicos.
- ✓ El kit de Western blot con tecnología propia desarrollada en Perú ha demostrado buen rendimiento diagnóstico para la confirmación de HTLV.

- ✓ El costo por prueba sería aproximadamente de sólo 10 dólares, siete veces menor que la prueba comercial.

RECOMENDACIONES

- Se sugiere que los resultados indeterminados sean resueltos por pruebas moleculares.
- Incorporar el kit en el Perú para reducir significativamente los costos de diagnóstico.

AGRADECIMIENTOS

A los Biólogos: Hermes Escalante por las orientaciones sobre la producción de kits comerciales de Western Blot; Estela Huamán por el apoyo en los cultivos celulares; Silvia Seraylan, Rosario Balta, Jesús Pinto y Nishon Rojas por el préstamo de cámaras electroforéticas y algunos reactivos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Anuario Estadístico 2014. Lima Perú, 2015. p.109
- 2) Villaverde JA, Romaní FR, Torres SM, Zunt JR. Transmisión Vertical de HTLV-1 en el Perú Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública. Mar 2011; 28(1): 101–8.
- 3) Moreno C, Balangero M, Barbás MG, Cudolá A, Gallego S. Diagnóstico serológico de HTLV-1/2: combinación de técnicas de tamizaje para definir el estatus serológico en donantes de sangre. *Rev. argent. microbiol.* 2013;45(3): 165-8.
- 4) INNO-LIA™* HTLV I/II Score. [Inserto]. INNOGENETICS.N.V. Technologiepark. Belgium. 2011.
- 5) Cánepa C, Salido J, Ruggieri M, Fraile S, Pataccini G, Berini C, et al. Low Proviral Load is Associated with Indeterminate Western Blot Patterns in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infected Individuals: Could Punctual Mutations be Related? *Viruses.* 2015; 7(11): 5643-658.