



11219
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN".

**Utilidad de la determinación de antígeno p24 del
VIH-1 por ELISA ultrasensible como un método
alternativo para la monitorización de pacientes con
infección por VIH-1**

T E S I S

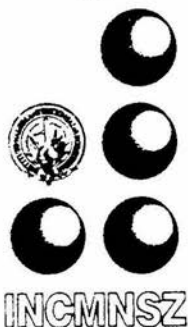
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA**

**PRESENTA:
Lucio Eduardo Martín del Campo Rodríguez**

**TUTOR PRINCIPAL
Dr. Luis Enrique Soto Ramírez**

**ASESORES DE TESIS:
Dr. Guillermo Ruiz Palacios
Dra. Angelina Villasis Keever**

México, D.F. Junio 2004





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección de los Colegios de Postgrado de la UNAM a que se inscriba en el sistema de inscripción y se imprima el boleto de inscripción de los trabajos recepcionales.

Nombre: Lucio Eduardo-Martín del

Campo Rodríguez

FECHA: 02 de Julio 04

FIRMA: 



SUBDIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Utilidad de la determinación de antígeno p24 del VIH-1 por ELISA ultrasensible como un método alternativo para la monitorización de pacientes con infección por VIH-1.

Alumno del curso de especialidad: Lucio Eduardo Martín del Campo Rodríguez.

Tutor principal:

Dr. Luis Enrique Soto Ramírez.

Asesores de Tesis:

Dra. Angelina Villasís Kever.

Dr. Guillermo Ruiz Palacios



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"DR. SALVADOR ZUBIRAN"
DIRECCION DE ENSEÑANZA
México, D.F.

Índice

Antecedentes.....	4
Justificación.....	14
Objetivos.....	15
Hipótesis.....	16
Material y métodos.....	17
Resultados.....	20
Discusión.....	25
Conclusión.....	27
Bibliografía.....	28

Antecedentes

Se estima que 40 millones de personas están infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y de ellas aproximadamente un 95% viven en países subdesarrollados¹.

El pronóstico y la calidad de vida de los pacientes infectados por el VIH han mejorado como resultado de la correcta aplicación de medidas de prevención específicas, de la mejoría en la atención y cuidados generales de los pacientes y sobre todo por la introducción en años recientes de la terapia antiretroviral altamente activa (TARAA), con una reducción de la morbilidad y de la mortalidad relacionadas al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)^{2,3}.

En los últimos años el acceso a TARAA para los pacientes con infección por el VIH ha aumentado en todo el mundo, sin embargo, para que esta terapia sea exitosa se requiere de una monitorización cuidadosa con pruebas inmunológicas y de evaluación de la replicación viral. La cuenta de linfocitos CD4+ y los niveles de RNA de VIH-1 en sangre son excelentes predictores de la progresión clínica de la enfermedad y de la respuesta al tratamiento antiretroviral. Tanto la cuantificación de linfocitos CD4 como de RNA viral son utilizados para decidir el momento óptimo de inicio de tratamiento antirretroviral y para evaluar la respuesta al mismo^{4,5}. La medición de la carga viral (CV) mediante la amplificación de RNA viral por RT-PCR (CV) es la prueba más sensible para valorar la carga de virus en sangre, por lo que la proporción de pacientes infectados que logran y mantienen una carga viral indetectable es un punto fundamental para la evaluación clínica de los pacientes que reciben regimenes de tratamiento antiretroviral⁶⁻⁸.

En la actualidad las guías de tratamiento para pacientes con infección por el VIH recomiendan el uso de CV en plasma para monitorización de TARAA. Las guías del departamento de salud de los Estados Unidos recomiendan que se inicie TARAA en

pacientes con CV igual o mayor de 55,000 copias. En aquellos pacientes que reciben TARAA se considera como criterio de falla a tratamiento cualquiera de los siguientes⁹: a) Una reducción de RNA plasmático menor de 0.5-0.75 logaritmos a las 4 semanas, o una reducción menor de 1 logaritmo a las 8 semanas de haber iniciado tratamiento antiretroviral, b) No lograr CV indetectable durante los primeros 6 meses de haber iniciado tratamiento antiretroviral, c) Una detección repetidamente positiva de virus en plasma después de haber logrado indetectabilidad, lo cual sugiere desarrollo de resistencia, d) Un aumento significativo en la CV, definido como 3 veces o más del nadir de RNA plasmático que no es atribuible a infección concurrente, a vacunación o a la metodología de la prueba y e) Descenso persistente en la cuenta de linfocitos CD4+.

La expresión del VIH en plasma, es un reflejo de la evolución de la infección, la cual puede ser valorada de dos formas: a nivel de RNA y a nivel proteico. La mayoría de los métodos disponibles establecidos hasta el momento miden la concentración de partículas asociadas al RNA viral, que se ha convertido en un marcador surrogado para la medición de la carga viral. Debido a que en los mecanismos de la patogenicidad viral están involucradas varias proteínas como mediadores directos o indirectos de enfermedad, es posible que la concentración de proteínas virales en varios compartimentos del cuerpo sea mejor en predecir la progresión de enfermedad que las partículas virales de RNA¹⁰.

Es importante mencionar que las pruebas de biología molecular como la determinación de CV son pruebas costosas que consumen una cantidad considerable de tiempo y que requieren de personal altamente capacitado para su realización, lo cual limita su uso sobre todo en países subdesarrollados en donde se requiere de métodos mas simples y de menor costo.

Entre los métodos alternativos a la CV que se han evaluado para medir la replicación viral a nivel proteico, se encuentra la determinación de antígeno p24 (Ag p24). El Ag p24 es uno de los componentes proteicos nucleares (cápside) del VIH, que conforma el receptáculo que encapsula su material genómico. Su denominación como p24, hace referencia a su peso molecular de 24 kilodaltons. Los tipos virales VIH-1 y VIH-2, además de los subtipos B y no B, poseen también la proteína p24 como componente del núcleo viral.

El Ag p24 y las partículas asociadas de RNA de VIH-1 están estrechamente relacionadas, ambas derivan de de RNA mensajero viral. El Ag p24 es un componente de los precursores proteicos Pr160gag-pol y Pr55gag, y esta estequiométricamente asociado con otro compuesto precursor que es p9 en la nucleocapside, el cual esta directamente involucrado en la encapsulación del RNA viral dentro de las partículas¹⁰. El Ag p24 es entonces un componente estructural importante de la partícula retroviral y se estima su presencia en 2000-4000 moléculas en cada virion¹¹. En contraste con el RNA de VIH-1, el Ag p24 puede encontrarse fuera de las células infectadas, ya sea como proteína soluble en el plasma, como proteína unida en inmunocomplejos, o como un componente de una partícula viral, a consecuencia de esto el RNA viral y el Ag p24, a pesar de estar estrechamente interrelacionados pueden originarse de fuentes comunes, pero no idénticas (**Figura 1**)¹⁰.

Las primeras versiones de los ensayos para la detección de Ag p24 que se utilizaron para evaluar la actividad del virus tenían una baja sensibilidad comparado con las técnicas de biología molecular, no podían detectar niveles bajos de CV y por lo tanto, eran inadecuados para evaluar la respuesta a tratamiento antiretroviral. Por otra parte las pruebas de biología molecular sí mostraban una adecuada sensibilidad para detectar niveles virales bajos por lo que se han utilizado como marcadores surrogados de la monitorización de la enfermedad¹².

La medición del Ag P-24 presenta tres problemas. Uno es la presencia de anticuerpos p24 específicos que forman complejos con antígenos provocando subdetección (**Figura 2b**)¹³⁻¹⁵, este problema es mejor ejemplificado en el curso de la infección temprana por VIH durante el cual el incremento las concentraciones de anticuerpos en plasma provocan la formación de inmunocomplejos con el Ag y la disminución de la capacidad de detección de este último. El segundo problema es la presencia de anticuerpos anti inmunoglobulinas, como el factor reumatoide lo cual puede dar reacciones falso-positivas (**figura 2c**) y el tercero es la baja sensibilidad de la prueba comparado con los métodos basados en ácidos nucleicos¹⁰. Para evitar estos problemas, se han realizado modificaciones para mejorar la técnica de detección de Ag p24. Se utilizó la acidificación de la muestra para disgregar los complejos antígeno-anticuerpo, incrementando la proporción de antígenos positivos¹⁶. Sin embargo, la experiencia con esta prueba mostró que una cantidad considerable de los antígenos no eran liberados del complejo o se volvían a asociar posteriormente cuando el pH de la muestra era neutralizado para realizar el ELISA para la detección de Ag p24. Por otra parte la acidificación ocasionaba una liberación de factor reumatoide a partir de los complejos inmunoglobulinas-anti-inmunoglobulinas preformados, agravando el problema de sobre detección o falsos positivos¹⁷. Estos problemas técnicos ocasionaba una medición poco precisa de la concentración real de Ag p24 en la muestra. Posteriormente se realizaron cambios para mejorar la detección del Ag introduciendo modificaciones que fueron primariamente dirigidas a aumentar la detección del Ag asociado a los anticuerpos contra p24. Uno de los progresos más significativos en la técnica fue la eliminación de los dos primeros problemas mediante la desnaturalización de proteínas mediada por calor. Con el calentamiento de la muestra a 100 °C por 5 minutos, se destruye la estructura tridimensional de los anticuerpos rompiendo las uniones Ag-Ac, y liberando el Ag p24 reactivo. Este simple

procedimiento permite medir la cantidad real de Ag en la muestra¹⁸⁻²⁰. La introducción del sistema de amplificación de la señal con tiramida y con la lectura cinética de la reacción mediante un programa diseñado para ello, aumento la sensibilidad de la prueba^{21,22}. El Ac detector, marcado con estreptavidina marcada con peroxidasa de rabano (HRPH), es utilizado como un Ac catalizador en la activación de la molécula de biotinil tiramida, cuya forma activada se une a los residuos de tirosina de cualquier proteína inmovilizada. La HRPH que es añadida, encuentra entonces grandes cantidades de sitios de unión, generando una señal intensificada que puede extender la curva estándar de 100 fg a 6'250, 000 fg¹⁰.

Desde su primera descripción en 1996, esta técnica ha sido evaluada para predecir progresión de la enfermedad y para monitorizar TAARA. La eficacia de la medición de p24 desnaturalizado por calor con amplificación de señal fue establecida primero en un estudio retrospectivo en niños de madres infectadas con VIH-1. La especificidad de p24 en 390 muestras de niños no infectados fue de 96.9% sin desnaturalizar y de el 100% cuando se utilizó la desnaturalización con calor. La sensibilidad diagnóstica en 125 muestras de niños infectados con una concentración mínima de p24 de 2 pg/ml fue de 96%, comparado con 47% con la técnica sin desnaturalizar, 96% con PCR para DNA del VIH-1 y 77% con cultivo viral²³. Con el uso del sistema de amplificación de señal con tiramida la sensibilidad del procedimiento mejoro sustancialmente con medición ahora de concentraciones muy bajas de p24, mostrando una sensibilidad similar a la determinación CV^{24,25}. La prueba ha sido valorada también en dos pequeños estudios sugiriendo que p24 tiene menor variabilidad intrapaciente que la CV. La variación diurna de p24 y la carga viral se evaluó en 4 puntos durante 2 años en 5 niños infectados. Los niveles de p24 tuvieron una desviación estándar media en logaritmo de 0.057 (rango 0.02-0.11) y una concentración de CV con un lóg. medio de 0.108 (rango 0.07-0.15)²⁶.

La utilidad de la determinación de los niveles de p24 para predecir progresión de la enfermedad ha sido evaluada también en dos estudios. En un estudio retrospectivo el valor predictivo de los niveles de p24 fue comparado con los niveles de CV para predecir progresión de la enfermedad. Para ello se evaluaron 169 pacientes con una media de linfocitos CD4 de 140 células/ μ l (0-1500), el promedio del tiempo de seguimiento fue de 2.7 años (0.1-4.9). Tanto los niveles de RNA viral como de p24 fueron buenos predictores de progresión a SIDA, el Ag p24 fue un buen predictor de disminución de linfocitos CD4, y fue superior al RNA viral para predecir sobrevida²⁷. En otro estudio se evaluó de manera prospectiva a 494 pacientes que tenían un promedio de linfocitos CD4 de 518 células/ μ l. En este estudio 90 pacientes (18%) progresaron a SIDA en 5 años, el Ag p24 correlaciono con el RNA viral ($r=0.55$; $p<0.0001$) y con los linfocitos CD4 ($r=-0.34$; $p<0.0001$). La concentración de p24 >5 pg/ml fue un predictor de progresión, comparable a las cifras de <350 linfocitos CD4+/mm³ y de $>30\ 000$ copias/ml de RNA VIH-1²⁸.

La determinación de Ag p24 para monitorización de TAARA fue estudiada por Boni et al en 23 pacientes con enfermedad avanzada que recibían su primer régimen TARA. Se compararon los niveles de p24 con los de RNA viral en 127 muestras de plasma con un seguimiento promedio de 25 semanas. En estos pacientes el Ag p24 fue positivo en 75.6% de las muestras y el RNA viral en 73.6%. Diecisiete muestras fueron negativas por ambas pruebas (13.6%). El RNA viral fue indetectable en 16 muestras (12.8%) en las cuales el Ag p24 se encontró con cifras entre 200 fg/ml y 18.9 pg/ml²⁵. Por otra parte Schupbach et al evaluaron prospectivamente a 55 pacientes que recibieron exitosamente tratamiento antiretroviral con un seguimiento promedio de 504 días. El antígeno p24 fue medido en 329 muestras de RNA VIH-1 menor a 50 copias/ml. Por análisis univariado y multivariado con regresión logística, el nivel de antígeno p24 mostró una correlación inversa tanto con los

niveles de linfocitos CD4 en la muestra ($p=0.013$) como con su cambio anual en cada paciente ($p<0.0001$). El Ag p24 tuvo una significancia similar entre los 48 individuos que nunca tuvieron un rebote virológico mayor de 400 copias/ml²⁹.

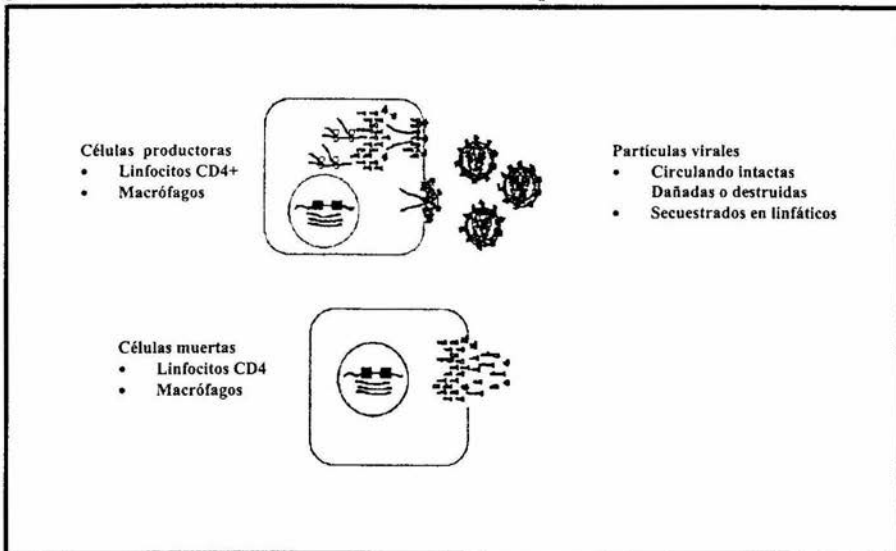
La combinación de desnaturalización por calor, el uso de plasma y amplificación de la señal con tiramida, hace que la prueba tenga una sensibilidad diagnóstica similar aunque no igual a la prueba Amplicor HIV-1 Monitor, versión 1.0 de Roche. Adicionalmente, el uso de un software que permita combinar mediciones de punto final y cinéticas en la evaluación de la reacción de ELISA, permite una cuantificación más precisa: de 0.5 pg/ml a más de 6 ng/ml. Permitiendo así que la cuantificación del Ag p24 sea posible en todas las muestras clínicas con una simple dilución. Si la prueba del antígeno p24 por ELISA ultrasensible se realiza en la forma correcta, es comparable a la determinación de CV en cuanto a sensibilidad y especificidad; correlaciona con las concentraciones de linfocitos T CD4+ y sus cambios, predice la disminución de linfocitos T CD4+, progresión del SIDA o muerte y finalmente permite un adecuado monitoreo del tratamiento antiretroviral¹⁰.

La detección de Ag p24 por amplificación de señal y desnaturalización por calor tiene diversas ventajas sobre la medición de carga viral por técnicas de biología molecular. 1) el antígeno es considerablemente más estable, 2) se afecta menos por variaciones en el tiempo y condiciones físicas durante el transporte al laboratorio y 3) la preparación de las muestras es más simple, el examen puede ser realizado con equipo disponible en la mayoría de los laboratorios en solo una fracción de tiempo, y a un menor costo. Por otra parte los ensayos de CV aunque sensibles requieren equipo costoso y gente experta en manejo de los mismos, se ha calculado que el costo del ensayo inmunoenzimático ultrasensible para la detección de Ag p24 es 10 veces menor que la determinación de CV por RT-PCR¹⁰. El bajo costo de esta prueba ofrece la oportunidad para una monitorización más frecuente que la que se puede

realizar con técnicas de biología molecular. Aun en países desarrollados, los servicios de salud pagaran únicamente por 2 a 4 mediciones CV por año, así pueden pasar varias semanas antes de que se identifique una falla terapéutica y el incremento en la replicación viral durante este periodo de ventana, especialmente si el rebote es con niveles elevados del virus, podrá generar mutaciones de resistencia secundarias que amenazaran la eficacia de la terapia antiretroviral²⁴.

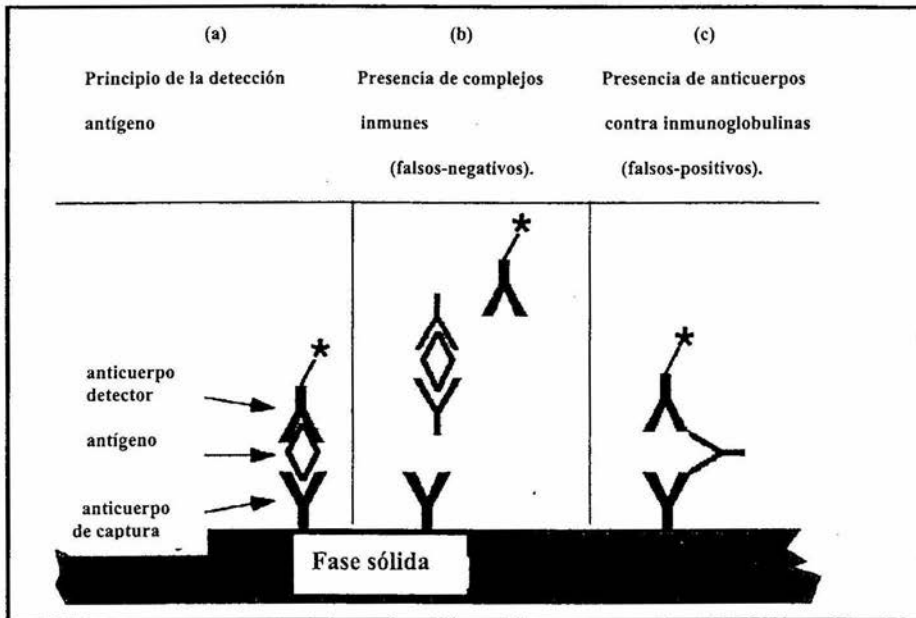
El propósito de este estudio es evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA ultrasensible para la detección de Ag p24 en muestras clínicas con valores predeterminados de CV medidos por RT-PCR.

Figura 1. Fuentes de antígeno p24 y RNA VIH-1 en el plasma



Posibles fuentes de antígeno p24 y RNA del VIH en plasma. El antígeno p24 se puede originar de diversos sitios incluyendo proteínas estructurales de partículas virales defectuosas o intactas presentes en la muestra o liberadas de partículas degradadas que se encuentran atrapadas en la red de células dendríticas foliculares de los linfáticos. El antígeno p24 se puede liberar también de células infectadas por el VIH o de células muertas por citotoxicidad mediada por inmunidad o muertas por citotoxicidad viral.

Figura 2. Detección de antígeno p24 y sus confusores.



Justificación

La monitorización de TARAA en México como en otros países subdesarrollados se realiza con determinaciones esporádicas de CV o bien en algunas regiones se lleva a cabo solo con medición de linfocitos CD4. Esto es debido a la existencia de laboratorios con poca infraestructura y carentes del personal capacitado para la realización de técnicas de biología molecular que además son costosas y que frecuentemente no pueden ser solventadas económicamente en estos países. Por ello se requiere de métodos más simples, que precisen poco soporte técnico, que sean efectivos, que tengan un menor costo y una buena sensibilidad para monitorizar el tratamiento de los pacientes.

La terapia antiretroviral está siendo cada vez más disponible para grandes segmentos de población en países subdesarrollados. En los últimos dos años el incremento de recursos federales a los programas de VIH en México ha traído como consecuencia un incremento en el número de pacientes con acceso a TAARA. La Secretaría de Salud de México se ha comprometido a cubrir con tratamiento antirretroviral al 100% de la población que lo necesite en México para finales de 2003³⁰, por lo que es indispensable contar con los medios para la monitorización periódica de los pacientes que reciban TARAA. Sin una monitorización periódica no se identificarán aquellos pacientes con falla virológica y esto limitará la efectividad de la terapia y podría promover el desarrollo y diseminación de cepas resistentes.

Existe hasta el momento poca información acerca de la efectividad en la monitorización de pacientes VIH-1 positivos con TARAA con métodos alternativos como lo es la medición de p24. En México no existen estudios preliminares referentes a la monitorización de pacientes con técnicas diferentes a la determinación de CV, aun cuando la determinación de Ag p24 se realiza de forma rutinaria en diversos sitios para evaluación diagnóstica y para investigación.

Objetivos

Objetivo general

1. Evaluar la utilidad de la determinación de Ag p24 por ELISA ultrasensible como prueba alternativa a la determinación de carga viral cuantitativa por RNA RT-PCR en pacientes con infección por el VIH-1.

Objetivos específicos

- a. Evaluar la correlación de los niveles de p24 por ELISA ultrasensible con los de carga viral por RNA RT-PCR.
- b. Evaluar la sensibilidad y especificidad de p24 por ELISA ultrasensible para detectar replicación viral detectable por RNA RT-PCR.

Hipótesis

La determinación de Ag p24 por ELISA ultrasensible es tan sensible como la determinación cuantitativa de carga viral por RNA RT-PCR, con una correlación del al menos 0.50 entre los niveles de carga viral y los niveles del Ag p24 ultrasensible lo cual permite equiparar ambas técnicas para la monitorización de TAARA en pacientes VIH positivos.

Material y métodos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de virología molecular, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. El área del laboratorio es dedicada al diagnóstico y análisis molecular.

Se evaluaron 84 muestras de plasma congeladas en el último año, de pacientes VIH-1 positivos en las cuales se determinó previamente CV (versión 1.5 Roche COBAS ultrasensible amplicor/monitor), para la determinación de niveles de Ag p24 ELISA ultrasensible.

Se realizó correlación de valores para p24 y CV en todas las muestras obtenidas determinando sensibilidad de p24 estratificándolas en los siguientes grupos:

1. Indetectables
2. >50- 399 copias
3. 400- < 1000 copias
4. 1000- 10 000
5. 10 001- 55 000
6. > 55 000

Se analizaron 80 muestras para determinar la distribución y la variabilidad interensayo.

Tipo de muestra y su manejo

La muestra utilizada para la prueba consiste en plasma, ya que se ha visto que el plasma contiene más Ag p24 que el suero¹². Las muestras se almacenaron a 4°C por varias semanas antes de ser sometidas a la prueba.

Cuantificación de Carga Viral.

Se cuantificó el RNA viral de virus libre mediante la prueba COBAS ultrasensible AMPLICOR/MONITOR v 1.5, la cual consiste en una transcripción reversa del ARN viral de

la región gag del virus con el siguiente juego de iniciadores SK145 y SKCC1B para generar ADN complementario (ADNc). Posteriormente este ADNc se amplifica mediante PCR; seguida a la amplificación se procede a hibridar los productos de PCR con sondas de oligonucleótidos blanco, y detección del complejo sonda-ADN amplificado por detección calorimétrica. La prueba ultrasensible puede cuantificar en un rango de 50 – 75,000 copias/ml.

Determinación de antígeno p24.

Se toma una fracción de plasma de muestras de sangre colectadas en vacutainer con EDTA, se recolecta plasma en un periodo no mayor de 4 horas y se congela a 70 °C hasta ser analizado.

Para la realización de la prueba se uso el método antes descrito por Nadal et al²⁶. Para su análisis se diluyo el plasma 1:6 en triton X100 al 0.5% (100 microlitros de plasma con 250 microlitros al 0.5 % de triton) en tubos de ependorf, se sometió a desnaturalización por calor por 5 minutos a 100 °C en un bloque para muestras con calor seco (Techne Cambridge UK dry heat block), el plasma tratado, la curva estándar y lo controles se transfirieron a los pozos de la placa del kit de HIV-1 p24 NEK050/A/B core profile ELISA (PekinElmer Sciencie Inc), incubándose de 12 a 20 horas en refrigeración (2-8°C). Posteriormente se remueven las muestras y se realizan 2 ciclos de cinco lavados con 300µl de buffer de lavado, se agrega a cada pozo 100µl del Ac detector biotinilado, incubándose por 1 hr. a 37°C, después de los ciclos de lavado (todos los ciclos de lavado se realizan igual que en el primer paso) se agrega a cada pozo 100µl de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (streptavidin HRP) incubando por 15 minutos a 37°C. Se realizan los lavados y se inicia el proceso de amplificación agregando a cada pozo 100 µl de la solución de biotiniil-tiramida incubándose a temperatura ambiente por 15 minutos para después lavar nuevamente y

agregar estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano esta vez diluida previamente con buffer de lavado al cual se le agrega albúmina bovina al 1% incubándose la placa a temperatura ambiente 15 minutos . Se agregan posteriormente 100µl de la solución del substrato de 2,2-difenil-5,6-dipiridilmetilidina (OPD) a cada pozo después de otros dos ciclos de lavados y se introduce la placa en el espectrofotómetro para las lectura cinéticas. La cinética de la reacción se determina con el programa de detección Quantakin (Perkin Elmer science, Chicago ill, USA) el cual hace lecturas cada minuto por 30 minutos al final de los cuales se realiza una lectura del punto final agregándose 100µl de la solución de paro. Para la cuantificación, el programa calcula un valor de corte correspondiente a la media de 3 desviaciones estándar.

Análisis estadístico

Se realizo el análisis de correlación entre Ag p24 y CV con el coeficiente de correlación de Pearson, transformando los resultados absolutos de ambos a logaritmos (\log_{10}).

Resultados

Sensibilidad y especificidad

Se evaluaron un total de 84 muestras del mismo número de pacientes. Las muestras se distribuyeron en los diferentes estratos de CV de la siguiente forma: 15 muestras con <50 copias/ml, 16 con 51 a 399 copias/ml, 15 con 400 a 1000 copias/ml, 14 con 1001 a 10 000 copias/ml, 12 con 10 001 a 55 000 copias/ml y finalmente 12 muestras con >55 000 copias/ml. La mediana de Ag p24 y CV en los diferentes estratos representado en \log_{10} se muestra en la tabla 1.

De las 84 muestras estudiadas, 52 fueron detectables por p24 (61.9%) y 69 (82.1%) por RNA RT-PCR. Una muestra detectada por Ag p24 ultrasensible fue negativa con el método de RNA RT-PCR. La sensibilidad global de p24 para establecer que una muestra tiene CV detectable por RT PCR fue de 74 % (Tabla 2).

Al evaluar los resultados de Ag p24 en los diferentes estratos de CV, se observó una sensibilidad del 100 % en las muestras con carga viral mayor de 3 000 copias/ml, con menor sensibilidad en los estratos con menor carga viral. En el estrato de 400 a 1000 copias/ml el 73 % de las muestras fueron positivas para Ag p24 ultrasensible, mientras que en el estrato de 51 a 399 copias/ml solo el 31% fueron positivas (Tabla 3).

Catorce de 15 muestras que se encontraron con CV por debajo del límite de detección (50 copias/ml) fueron también indetectables por Ag p24 para una especificidad de 93.3 % (Tabla 2), el valor predictivo positivo de la prueba de acuerdo a los resultados obtenidos fue de 0.980 y el valor predictivo negativo fue de 0.437. La correlación de ambas pruebas fue de $r=0.61$, $p=0.001$ (Figura 1).

Variabilidad intraensayo

Para analizar la variabilidad intraensayo se evaluaron 42 muestras en duplicado de diferentes estratos, en treinta y un muestras (74%) se obtuvieron resultados idénticos, mientras que en las restantes 11 (26 %) en las cuales se tuvieron resultados desiguales se observó una variabilidad marcada en los diferentes estratos de CV, teniendo diferencias en fg/ml entre los duplicados con porcentajes del 30 al 86 % con una media de 61 % con una mayor variabilidad en las muestras con CV menor de 10 000 copias/ml (70 %) (**Tabla 4**).

Tablas y Figuras

Tabla 1. Valores comparativos de carga viral (copias/ml) mediante la técnica de RT-PCR y antígeno p24 (fg/ml) mediante la técnica de ELISA ultrasensible

Estratos por No. de copias/ml	No. de muestras	RNA RT-PCR*		Ag p24*	
		Rango	mediana	Rango	mediana
51-399	16	1.76-2.48	2.24	2.71-2.99	2.13
400-1000	15	2.63-2.99	2.82	2.71-4.21	2.74
1001-10 000	14	3.07-3.97	3.38	2.81-4.38	3.98
10001-50000	12	4.08-4.70	4.50	3.73-4.98	4.59
55 0000	12	4.75-5.72	5.02	4.09-6.60	4.81

* Los valores están expresados en Log_{10}

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad de la determinación de antígeno p24 por ELISA ultrasensible.

		Carga viral (copias/ml)		
		Detectable	Indetectable	Total
Antígeno p24 fg/ml	Detectable	>50	<50	52
	>520	51	1	
	Indetectable	>520	<520	32
	<520	18	14	
Total		69	15	84

Sensibilidad del Ag p24: 74 %. especificidad: 93 %
 Valor predictivo positivo: 0.980. Valor predictivo negativo: 0.437

Tabla 3. Muestras positivas del antígeno p24 por ELISA ultrasensible comparado con la determinación de RNA viral por RT-PCR ultrasensible en diferentes estratos.

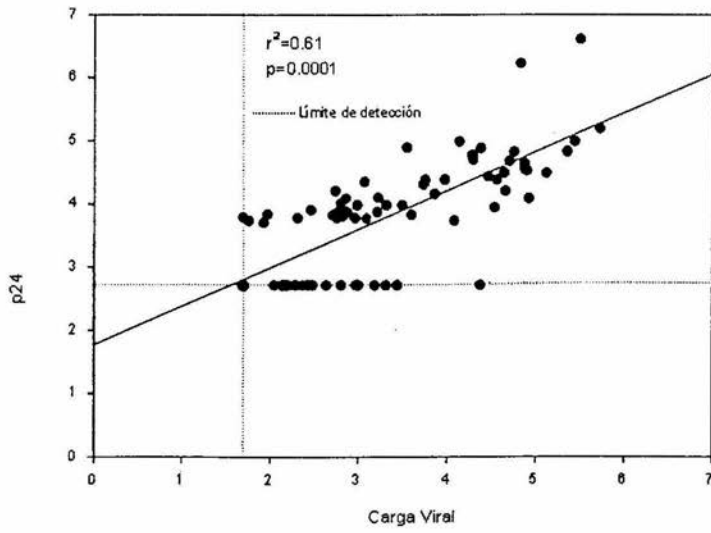
Estratos de CV	RNA viral por RT-PCR	p24 por ELISA ultrasensible	% p24 positivos en relación a RNA viral
51 a 399	16	5	31
400 a 1000	15	11	73
1001-10 000	14	11	79
10 001- 55 000	12	12	100
>55 000	12	12	100

*Todas las muestras con CV mayor a 3 000 copias fueron positivas por ELISA p24 ultrasensible

Tabla 4. Variabilidad intraensayo en 42 muestras analizadas por duplicado el mismo día

Estratos (copias/ml)	No de muestras	$\Delta < 15 \%$	$\Delta > 15 \%$	Concordancia
< 50	6	6	0	100 %
51-399	8	5	3	62.5 %
400-1000	8	7	1	87.5 %
1001-10 000	7	6	1	85.7 %
10 000-55 000	7	4	3	57.1 %
> 55 000	6	3	3	50 %
Total	42	31	11	74 %

Figura 1. Correlación de muestras por ambos métodos en \log_{10}



Discusión

Los elevados costos para realizar las técnicas de biología molecular para la determinación de carga viral del VIH-1 como la medición de RNA por RT-PCR así como la necesidad de contar con personal altamente entrenado para realizarlas han obligado a la búsqueda de alternativas menos costosas y más simples de realizar. La prueba de ELISA ultrasensible para Ag p24 es una de estas alternativas y se ha evaluado ya en diversos estudios comparándola con otras técnicas como la disociación ácida y con técnicas de biología molecular como la CV por RT-PCR en la monitorización del tratamiento antiretroviral en pacientes VIH-1 positivos.

En este estudio al comparar la medición del Ag p24 por ELISA ultrasensible con la medición de RNA RT-PCR, los niveles individuales de Ag p24 tuvieron un coeficiente de correlación con los niveles de RNA viral de $r= 0.61$, similar a lo reportado por otros autores como Shüpbach et al¹⁹ quien reporto en 116 muestras una correlación entre ambos métodos de $r=.553$; Pascual et al²⁴ también reporto resultados similares en 130 muestras con una correlación entre ambos métodos de $r= 0.596$.

En lo referente a la sensibilidad del Ag p24 por ELISA ultrasensible, aun cuando se ha visto que es mejor que la sensibilidad de la prueba de Ag p24 realizada con técnica estándar o que la realizada con el método de disociación ácida¹², en este estudio como en otros ya reportados previamente, se ve claramente una menor sensibilidad de esta técnica comparada con la determinación de CV por RNA RT-PCR^{12,24,25} especialmente en las muestras con CV menor de 3 000 copias/ml. Se observo una mayor detectabilidad del Ag p24 conforme aumento la CV, con una detección del 86% en las muestras cuando la CV por RNA RT-PCR fue mayor de 400 y con un 100 % de detección cuando la carga viral fue mayor de 10 000 lo cual es superior a los reportado por Pascual et al²⁴ quien reporto muestras detectables en solo dos

tercios de las muestras con CV menor de 10 000 (18/27) y en 87 % de las muestras con CV mayor de 10 000 (47/54). Anteriormente Shupbach reporto una menor sensibilidad con la medición de p24 ultrasensible por ELISA cuando los pacientes tenían cargas virales 1000 copias/ml y linfocitos CD4+ > 500¹².

De acuerdo a los resultados obtenidos es probable que en los casos en los que se tengan rebotes virológicos de indetectable a menos de 1000 copias/ml (bleeps) el antígeno p24 no se detectara al menos en el 16 % (5 de 30) de las muestras de acuerdo a nuestro estudio. Así mismo los pacientes que presenten falla virológica persistente con cifras menores de 3 000 copias no podrán identificarse en un 20 % lo cual supone un impacto importante desde el punto de vista de salud pública ya que una proporción importante de pacientes que se presenten en falla con estos niveles no se podrán diagnosticar oportunamente favoreciendo con esto la aparición de mutaciones y el desarrollo de resistencia cruzada a los antiretrovirales.

En cuanto al comportamiento de el Ag p24 ultrasensible en las 84 muestras, en 15 muestras negativas por RNA RT-PCR se observo que solo una de estas fue positiva para Ag p24, esto podría sugerir la persistencia de proteínas no asociadas a partículas virales y que están presentes como proteínas libres o en inmunocomplejos y que no se eliminan por la ultracentrifugación en la muestras y que pudieran causar una interpretación errónea del resultado en relación a la eficacia del tratamiento.

El hecho de que las muestras hayan estado congeladas por 3 a 6 meses y el que algunas de ellas se sometieron a 2 o 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento puede ser una limitación del estudio ya que se ha demostrado que la cantidad de antígeno puede disminuir por ciclos repetidos de descongelamiento lo cual influye en la detectabilidad del mismo y por lo tanto en su sensibilidad.

La prueba presenta variabilidad intraensayo marcada, ya que se presentó en un 26 % del total de las muestras, destacando una diferencia porcentual superior al 50 % entre cada uno de los duplicados, superior a el 15 % establecido como normal para la variabilidad intraprueba, acentuándose dicha variabilidad en los estratos con CV menor de 3 000 copias.

Conclusión.

La monitorización de TARA mediante la medición de los niveles de antígeno p24 por medio de ELISA ultrasensible se ha mostrado como una buena alternativa a la medición de RNA RT-PCR por algunos grupos encontrando al igual que en el presente estudio una buena correlación con carga viral. La prueba presentó una menor detectabilidad en las muestras con menos de 3000 copias afectando con ello su sensibilidad en este estrato, sin embargo esto pudo estar influido por la variabilidad intraensayo determinada a su vez por problemas operador dependiente, o inherentes al ensayo. La prueba presenta un buen índice de correlación y una sensibilidad global intermedia, será necesario realizar estudios que evalúen la sensibilidad y la variabilidad sobre todo en los estratos con menos de 10 000 copias/ml para evaluar la utilidad real de la prueba.

Referencias:

1. UNAIDS/World Health Organization. 2001. AIDS epidemic update 2001. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS-World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998;338:853–60.
3. Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, Lindegren ML, Holmberg S, Jones JL. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2000;30:S5-14.
4. Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996;272:1167-70
5. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR Jr. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997;126:946-54.
6. Coombs RW, Welles SL, Hooper C, Reichelderfer PS, D'Aquila RT et al. Association of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups. *J Infect Dis* 1996;174:704-12.

7. O'Brien WA, Hartigan PM, Daar ES, Simberkoff MS, Hamilton JD. Changes in plasma HIV RNA levels and CD4+ lymphocyte counts predict both response to antiretroviral therapy and therapeutic failure. VA Cooperative Study Group on AIDS. *Ann Intern Med.* 1997;126:939-45.
8. Saag MS, Holodniy M, Kuritzkes DR, O'Brien WA, Coombs R, Poscher ME, Jacobsen DM, Shaw GM, Richman DD, Volberding PA. HIV viral load markers in clinical practice. *Nat Med* 1996;2:625-29.
9. US Department of Health and Human Services. USPHS/IDSA guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. 2003 nov, Rockville, MD: HIV/AIDS treatment information service. Available at <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines/>.
10. Schüpbach J. Measurement of HIV-1 p24 antigen by signal-amplification-boosted ELISA of heat-denatured plasma is a simple and inexpensive alternative to tests for viral RNA. *AIDS Rev* 2002;4:83-92.
11. Coffin J. Retroviridae: The viruses and their replication. In: Fields B, Knipe D, Howley P (eds.) *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996:1767-847.
12. Schupbach J, Flepp M, Pontelli D, Tomasik Z, Luthy R, Boni J. Heat-mediated immune complex dissociation and enzyme-linked immunosorbent assay signal amplification render p24 antigen detection in plasma as sensitive as HIV-1 RNA detection by polymerase chain reaction. *AIDS* 1996;10:1085-90.
13. Lange J, Paul D, De Wolf F, Coutinho R, Goudsmit J. Viral gene expression, antibody production and immune complex formation in human immunodeficiency virus infection. *AIDS* 1987;1:15-20.

14. de Wolf F, Goudsmit J, Paul DA, Lange JM, Hooijkaas C, Schellekens P, Coutinho RA, van der Noordaa J. Risk of AIDS related complex and AIDS in homosexual men with persistent HIV antigenaemia. *Br Med J* 1987;295:569-72.
15. Pedersen C, Nielsen CM, Vestergaard BF, Gerstoft J, Krogsgaard K, Nielsen JO.. Temporal relation of antigenaemia and loss of antibodies to core antigens to development of clinical disease in HIV infection. *Br Med J* 1987;295:567-69.
16. Miles SA, Balden E, Magpantay L, Wei L, Leiblein A, Hofheinz D, Toedter G, Stiehm ER, Bryson Y. Rapid serologic testing with immune-complex-dissociated HIV p24 antigen for early detection of HIV infection in neonates. Southern California Pediatric AIDS Consortium. *N Engl J Med* 1993;328:297-302.
17. Gutiérrez M, Vallejo A, Soriano V. Enhancement of HIV antigen detection after acid dissociation of immune complexes is associated with loss of specificity [letter]. *Vox Sang* 1995;68:132-3.
18. Schupbach J, Boni J. Quantitative and sensitive detection of immune-complexed and free HIV antigen after boiling of serum [published erratum appears in *J Virol Methods* 1993;43:247-56].
19. Schupbach J, Boni J, Flepp M, Tomasik Z, Joller H, Opravil M. Antiretroviral treatment monitoring with an improved HIV-1 p24 antigen test: an inexpensive alternative to tests for viral RNA. *J Med Virol* 2001;65:225-32.
20. Sutthent R, Gaudart N, Chokpaibulkit K, Tanliang N, Kanoksinsombath C, Chaisilwatana P. p24 Antigen detection assay modified with a booster step for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Microbiol* 2003;41:1016-22.

21. Giacomini M, McDermott JL, Giri AA, Martini I, Lillo FB, Varnier OE. A novel and innovative quantitative kinetic software for virological colorimetric assays. *J virol Methods* 1998;73:201-9.
22. Goldschmidt PL, Devillechabrolle A, Ait-Arkoub Z, Aubin JT. Comparison of an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with procedures based on molecular biology for assessing human immunodeficiency virus type 1 viral load. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:513-18.
23. Schupbach J, Boni J, Tomasik Z, Jendis J, Seger R, Kind C. Sensitive detection and early prognostic significance of p24 antigen in heat-denatured plasma of human immunodeficiency virus type 1-infected infants. *Swiss Neonatal HIV Study Group J Infect Dis* 1994;170:318-24.
24. Pascual A, Cachafeiro A, Funk ML, Fiscus SA. Comparison of an assay using signal amplification of the heat-dissociated p24 antigen with the Roche Monitor human immunodeficiency virus RNA assay. *J Clin microbiol* 2002;40: 2472-75.
25. Boni J, Opravil M, Tomasik Z, Rothen M, Bisset L, Grob PJ, Luthy R, Schupbach J. Simple monitoring of antiretroviral therapy with a signal-amplification-boosted HIV-1 p24 antigen assay with heat-denatured plasma. *AIDS* 1997;11:F47-F52.
26. Nadal D, Boni J, Kind C, Varnier OE, Steiner F, Tomasik Z, Schupbach J. Prospective evaluation of amplification-boosted ELISA for heat-denatured p24 antigen for diagnosis and monitoring of pediatric human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1999;180:1089-95.
27. Ledergerber B, Flepp M, Boni J, Tomasik Z, Cone RW, Luthy R, Schupbach J. Human immunodeficiency virus type 1 p24 concentration measured by boosted ELISA of heat-denatured plasma correlates with decline in CD4 cells, progression to

- AIDS, and survival: comparison with viral RNA measurement. *J Infect Dis* 2000;181:1280-88.
28. Sterling TR, Hoover DR, Astemborski J, Vlahov D, Bartlett JG, Schupbach J. Heat-denatured human immunodeficiency virus type 1 protein 24 antigen: prognostic value in adults with early-stage disease. *J Infect Dis* 2002;186:1181-85.
29. Schupbach J, Boni J, Bisset LR, Tomasik Z, Fischer M, Gunthard HF, Ledergerber B, Opravil M; Swiss HIV Cohort Study. HIV-1 p24 antigen is a significant inverse correlate of CD4 T-cell change in patients with suppressed viremia under long-term antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;33: 292-99.
30. Secretaria de salud. Programa nacional de salud 2001-2006. 2001, Secretaria de salud México.
31. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267:483-89.