

# TEHNICI ALTERNATIVE DE DIAGNOSTIC ȘI MONITORIZARE A INFECȚIEI HIV

## *Alternative techniques for diagnosis and monitoring of HIV*

Mihaela Comănici<sup>1</sup>, Adrian Comănici<sup>1,2</sup>, Dan Duiculescu<sup>1,3</sup>, Emanoil Ceașu<sup>1,4</sup>,  
Ludovic Păun<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Facultatea de Medicină, Universitatea „Titu Maiorescu”, București

<sup>2</sup>Spitalul Clinic CF 2, București

<sup>3</sup>Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. Victor Babeș”, București

<sup>4</sup>Universitatea de Medicină „Carol Davila”, București

### REZUMAT

Pentru diagnosticul infecției HIV, metodele curente pot fi grupate în două categorii: metode serologice, cele care identifică răspunsul imun în anticorpi, și metode care stabilesc prezența și cantitatea virusului sau a unor produse virale. Din categoria testelor de detecție a virusului și a produselor virale, determinarea cantitativă a antigenului capsidar Agp24 (antigenemia p24) oferă o posibilitate atractivă ca marker indirect al concentrației virionilor.

**Concluzie.** Prezentul articol susține că determinarea Ag p24 reprezintă o soluție tehnică importantă în diagnosticul și supravegherea infecției HIV/SIDA.

**Cuvinte cheie:** infecție HIV, diagnostic, monitorizare

### ABSTRACT

For the diagnosis of HIV infection, current methods can be grouped into two categories: serological methods, identifying the immune response in antibodies, and methods that determine the presence and quantity of virus or viral products. In the category of virus detection tests and viral products, the quantitative determination of capsidar Agp24 antigen (p24 antigenemia) provides an attractive possibility as indirect marker of virions concentration.

**Conclusion.** The present paper support that p24 Ag determination is an important technical solution in the diagnosis and surveillance of HIV / AIDS.

**Key words:** HIV infection, diagnosis, monitoring

### INTRODUCERE

Pentru diagnosticul infecției HIV, metodele curente pot fi grupate în două categorii: metode serologice, cele care identifică răspunsul imun în anticorpi, și metode care stabilesc prezența și cantitatea virusului sau a unor produse virale. Din categoria testelor de detecție a virusului și a produselor virale, determinarea cantitativă a antigenului capsidar Agp24 (antigenemia p24) oferă o posibilitate atractivă ca marker indirect al concentrației virionilor.

P24 este o proteină HIV-1 importantă din punct de vedere diagnostic, folosită în testele de screening

HIV-1/2 de a patra generație. Proteina capsidală p24 (24-27 kDa) îmbracă cele două molecule de ARN ale virusului HIV și enzimele asociate, fiind un component arhitectonic major. P24 rezultă din clivajul poliproteinei p55 gag, care, postranlațional, se fosforilează. Rolurile proteinei capsidale p24 sunt multiple: rol în asamblarea particulei virale și morfogeneza (delețiile sau mutageneza în proteina p24 inhibă formarea virionilor) și rol de protecție a genomului viral. Producția și eliberarea din celulele infectate a p24 și a ARN HIV -1 asociat virionilor sunt în strânsă legătură. Ambele derivă din ARN mesager neprelucrat (unspliced), iar p24 este o

Adresă de corespondență:

Dr. Adrian Comănici, Clinica de Endocrinologie, Spitalul Clinic CF 2, B-dul Mărăști Nr. 63 Sector 1

e-mail: adrian\_comanici@yahoo.com

componentă a precursorilor p160 (gag-pol) și p55 (gag) și este legat stoichiometric de p9, o altă componentă a precursorului direct implicată în procesele de încapsidare a ARN viral.

În timpul infecției acute, testul pentru Agp24 detectează proteina p24 înaintea apariției anticorpilor anti HIV. Aceasta apare la scurt timp după infectare, din cauza vârfului inițial de replicare virală și se asociază cu niveluri crescute ale viremiei în timpul cărora persoanele infectate prezintă un potențial mare de transmitere a infecției. (1) Studiile timpurii la seroconvertori au arătat că evidențierea p24 este un factor de predicție a progresiei la SIDA mai sugestiv decât încărcătura virală.

### **DETECTAREA ANTIGENEMIEI P24 (DETECȚIA HIPERSENSIBILĂ ȘI CUANTIFICAREA ANTIGENULUI P24 PRIN DISOCIEREA TERMICĂ A COMPLEXELOR IMUNE ȘI AMPLIFICAREA SEMNALULUI ENZIMATIC)**

Specificitatea de detecție a antigenului p24 se apropie de 100% în numeroase cazuri investigate, indiferent de subtipul viral și de proveniența trusei utilizate. P24 este o componentă virală structurală majoră, a cărei prezență se estimează la 1.200 molecule/virion, fiind necesare aproximativ 20.000 copii virale pentru a detecta 1 pg de antigen p24 la sensibilitatea ELISA® standard. Deși specificitatea de detecție este unanim recunoscută ca apropiindu-se de 100% în numeroase cazuri investigate, indiferent de proveniența trusei utilizate (2,3), parametrul contestat este sensibilitatea. Detectarea antigenemiei p24 se face prin metode ELISA®, care utilizează anticorpi biotiniți și care cresc sensibilitatea testării. Antigenul p24 se găsește în ser fie sub formă liberă, fie în complexe imune legat de anticorpii anti p24. Sensibilitatea de detecție a Agp24 a putut fi îmbunătățită de 2-4 ori prin pretratarea eșantioanelor de ser sau plasmă în scopul disocierii complexelor imune și capturarea mai eficientă a Ag p24 liber. (4,5) Disocierea complexelor imune a fost realizată prin acidificare cu acid clorhidric HCl, glicocol pH 1,8 sau prin tratare cu alcali (6), în urma disocierii având loc eliberarea Agp24 din complexele Agp24-Ac antip24. Urmare a pretratării eșantioanelor de ser sau plasmă, sensibilitatea testării a crescut, dar trebuiau soluționate două probleme importante: coagularea serurilor sau a plasmelor pretratate, în special a celor congelate, analizate retrospectiv, în urma stocării îndelungate și prezența în serurile sau plasmelor pretratate a anticorpilor anti-imunoglobuline care pot genera rezultate fals pozitive. Problema coagulării eșantioanelor a fost rezolvată prin punerea la punct a unei noi metode

disociere termică în prezența detergenților (6,7). Coagularea serurilor sau a plasmelor inerentă la 100°C este evitată prin diluarea acestora în proporție de 1:5, iar detergențul folosit este Triton X-100. Mai mult decât atât, denaturarea termică prin fierbere la 100°C distruge structura tridimensională a anticorpilor preexistenți (în stare liberă sau eliberați din complexe imune), ceea ce elimină ireversibil atât riscul rezultatelor fals negative, cât și pe cel al rezultatelor fals pozitive. De asemenea, pragul de detecție ce ar putea fi afectat prin diluarea de 6 ori a probelor analizate este mult îmbunătățit (< 0,15 pg/ml; de 100x mai sensibil decât media testelor standard) printr-o etapă de amplificare catalizată a semnalului reacției enzimatică. Protocolul de lucru folosit crește semnificativ sensibilitatea de detecție a Ag p24 și a fost pus la punct de cercetătorii de la Swiss National Center for Retroviruses și Universitatea din Zürich (8).

Ca și protocol de lucru, proba este diluată 1:5 cu Triton X-100 0,5% și încălzită la 100°C timp de 5 minute în baie uscată termostată. Un volum de 0,25 ml de plasmă tratată a fost transferat în microplaca (HIV-1 p24 Core Profile ELISA®, NEN™ Life Science Products, Inc. Boston, MA) și incubat cu agitare timp de 2 ore la temperatura camerei. După expirarea perioadei de incubare, s-a efectuat spălarea materialului nereacționat cu TFS (tampon fosfat salin) suplimentat cu Tween 80 0,2%. Procesul de spălare a fost repetat întocmai după fiecare din etapele prezentate în continuare.

S-a adăugat 0,1 ml de anticorp detector (biotinilat) care a fost incubat 1 oră la 37°C. Volumul de pipetare pentru toți reactivii adăugați ulterior în microplacă a fost de 0,1 ml.

S-a adăugat streptavidina-peroxidaza pentru 15 minute la 37°C, apoi reactivul tyramide-biotinilat (ELAST® ELISA Amplification System, NEN™ Life Science Products, Inc. Boston, MA), pentru alte 15 minute, la temperatura camerei. A urmat o etapă de incubare la temperatura camerei timp de 15 minute, cu o cantitate suplimentară de streptavidină-peroxidază diluată în TFS-BSA 1%.

În final s-a adăugat soluția de substrat-cromogen (orto-fenilen diamina), iar microplaca a fost introdusă imediat în cititorul ELISA® (PR1100, Bio-Rad, Hercules, CA) în vederea efectuării citirii cinetice a densității optice la 650 nm (30 citiri, cu agitare, în primele 10 minute de incubare). După 30 minute reacția a fost oprită prin pipetarea soluției de stopare, permițând o citire end-point la 490 nm.

Controlul citirilor, înregistrarea densităților optice și prelucrarea datelor (validare test, curba eta-

lon, calculul cut-off, extrapolări din domeniul liniar, calculul rezultate și interpretare) au fost efectuate de programul Quanti-Kin ICD Agp24 3-Plus (DL3 Diagnostica Ligure s.r.l., Genoa, Italy) (16).

Cu această metodă, cuantificarea Agp24 este posibilă în domeniul 0,5-6500 pg/ml, iar prin extrapolarea domeniului liniar, limita superioară de detecție poate fi depășită. Sensibilitatea și utilitatea metodei de lucru folosită – detecția hipersensibilă și cuantificarea antigenului p24 prin disocierea termică a complexelor imune și amplificarea semnalului enzimatic – a fost demonstrată în mai multe studii, prin comparație cu determinarea ARN viral la diverse categorii de bolnavi infectați HIV, aflați sau nu în tratament. (9-13). Deoarece unele observații au sugerat detecția suboptimă a p24 din cauza procedurilor de disociere și excluzând aplicarea incorectă a acestora, s-a introdus un nou reactiv (tamponul SNCR, ce conține un amestec de detergent), ce permite detecția p24 cu o rată de 1,5-3 ori mai mare față de toate procedeele anterioare, la o sensibilitate de cel puțin 350 de ori mai bună. Noul procedeu de disociere cu tampon SNCR s-a dovedit eficient în probe cu încărcătură nedetectabilă (sub 5 copii/ml), provenite de la adulții tratați HAART pe durată îndelungată, la care s-a exclus o posibilă lipsă de specificitate a testului.

## CONCLUZII

Detecția hipersensibilă și cuantificarea Agp24 prin denaturarea termică a complexelor imune și amplificarea catalizată a semnalului enzimatic îmbunătățește performanțele testului cu 10 ordine de mărime la limita de detecție și cel puțin un ordin de mărime la limita de cuantificare. Aceste performanțe elimină orice îndoială asupra sensibilității de detecție, reducând probabilitatea rezultatelor fals negative sau a celor fals pozitive. Toate interferențele

datorate anticorpilor p-24 sau anti-imunoglobuline sunt eliminate prin distrugerea termică a structurii tridimensionale a acestora (6,7), iar sensibilitatea analitică, asigurată de etapa simplă a amplificării semnalului enzimatic, este suficientă pentru a detecta antigenemia p24 la marea majoritate a pacienților HIV pozitivi. (14,15) Costul testului hipersensibil este de 10 ori mai redus în comparație cu determinarea încărcăturii virale, iar condițiile de lucru și experiența tehnică sunt cele obișnuite în orice laborator în care se execută tehnica ELISA. Programul Quanti-Kin dedicat operează cititoare de microplăci obișnuite, utilizarea software fiind opțională.

În prezent, p24 este folosit și recunoscut ca test de diagnostic al copiilor născuți din mame pozitive și are șanse de a deveni un test alternativ de monitorizare a bolnavilor HIV/SIDA cronici. Datorită sensibilității crescute a metodei folosite, a relației cu evoluția clinică și imunologică, a faptului că Agp24 poate constitui un marker precoce pentru progresia bolii, dozarea antigenemiei p24 cu tehnica hipersensibilă ar putea folosi monitorizării infecției HIV în faza asimptomatică și simptomatică în scopul instituirii terapiei antiretrovirale. De asemenea Agp24 și-a demonstrat utilitatea în ceea ce privește monitorizarea terapiei antiretrovirale, lucru susținut de studii potrivit cărora 34% dintre pacienții tratați HAART și care s-au menținut nedetectabili în medie timp de 25 de luni erau p 24 pozitivi. Astfel, concentrațiile p24 măsurate la acești bolnavi au prezis cu precizie recăderile observate ulterior cu ocazia întreruperii terapiei (structurate pe termen scurt sau lung) și că pozitivitatea nu era un artefact, ci o realitate.

Toate aceste argumente susțin că determinarea Ag p24 reprezintă o soluție tehnică importantă în diagnosticul și supravegherea infecției HIV/SIDA.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Darr ES, Mougdlil T, Mezer RD, et al. – Transient high levels of ale viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324:961-964
2. Daar ES, et al. – (2001) *Annals Int Med* 134(1):25
3. Guay La, et al. – (2000) *J Med Virol* 62(4):426
4. Ascher DP, et al. – (1992) *J AIDS* 5:1080
5. Vasudevachari MB, et al. – (1993), *J Clin Immunol* 13:1
6. Steindl F, et al. – (1998) *J Immunol Methods* 217 (1-2):143
7. Schupbach J, Boni J – (1993). *J Virol Methods* 45(2):245,247
8. Schupbach et al – *AIDS*, 10:1085 (1996)
9. Nadal D et al – *J Infect Dis*, 180(4):1089 (1999)
10. Schupbach J et al. – *Int J Antimicrob Agents*, 16(4) : 441(2000)
11. Ledergerber B et al – *J Infect Dis*, 181(4):1280(2000)
12. Goldschmidt PL et al – *Clin Diag Immunol*, 5(4):513(1998)
13. Pascual A et al – *J Clin Microbiol*, 40(7):2472(2002)
14. Schupbach et al – *AIDS*, 10:1085(1996)
15. Lyamuya E et al – *J Acquir Defic Syndr Hum Retrovirol*, 12(4):421 (1996)
16. Giacommini M, et al. (1998). *J Virol Methods* 73 : 201