

## Diseño y evaluación de un ensayo diagnóstico para la detección de secuencias del ADN del VIH-1

Gariglio Rosana C.<sup>1</sup>, Taborda Miguel A.<sup>2</sup>, Giri Adriana A.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Biotecnología, Wiener Laboratorios S.A.I.C., 2000 Rosario, Argentina.

<sup>2</sup> Área Virología, Departamento Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, 2000 Rosario, Argentina.

<sup>3</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), 2000 Rosario, Argentina.

[rgariglio@wiener-lab.com.ar](mailto:rgariglio@wiener-lab.com.ar) ; [agiri@fbioyf.unr.edu.ar](mailto:agiri@fbioyf.unr.edu.ar)

En este trabajo se presenta el desarrollo de un método diagnóstico para la detección del ADN de VIH-1 y evaluación de la performance para su uso como herramienta diagnóstica en individuos de la región. El método se basa en purificación del ADN genómico de células mononucleares de sangre periférica mediante lisis diferencial, amplificación por PCR y detección de amplicones mediante hibridización líquida y revelado colorimétrico. El método presenta excelente performance, es de fácil manipulación, estable y no requiere instrumental ni laboratorios de alta complejidad. Su aplicación resultaría relevante como marcador de remisión cuando se disponga de terapias que efectivamente erradiquen la infección.

### Introducción

La determinación del ADN del VIH-1 es de gran utilidad en el diagnóstico temprano e inequívoco de la infección, en la detección precoz de la transmisión vertical y permite tomar las decisiones terapéuticas correspondientes. La detección directa de secuencias de ADN del VIH-1 presenta alta sensibilidad y especificidad, es rápida y no requiere laboratorios de alta complejidad. Además, la determinación del provirus podría convertirse en el ensayo de elección en la evaluación de nuevas drogas antivirales, que puedan erradicar las células crónicamente infectadas que constituyen uno de los reservorios más importantes del virus.

Sin embargo, resulta imperiosa la necesidad de estandarización de las pruebas moleculares del ADN del VIH-1 y la validación de su *performance* con muestras de la región donde el método será utilizado como herramienta diagnóstica de esta infección.

### Materiales y Métodos

#### Fundamentos del método

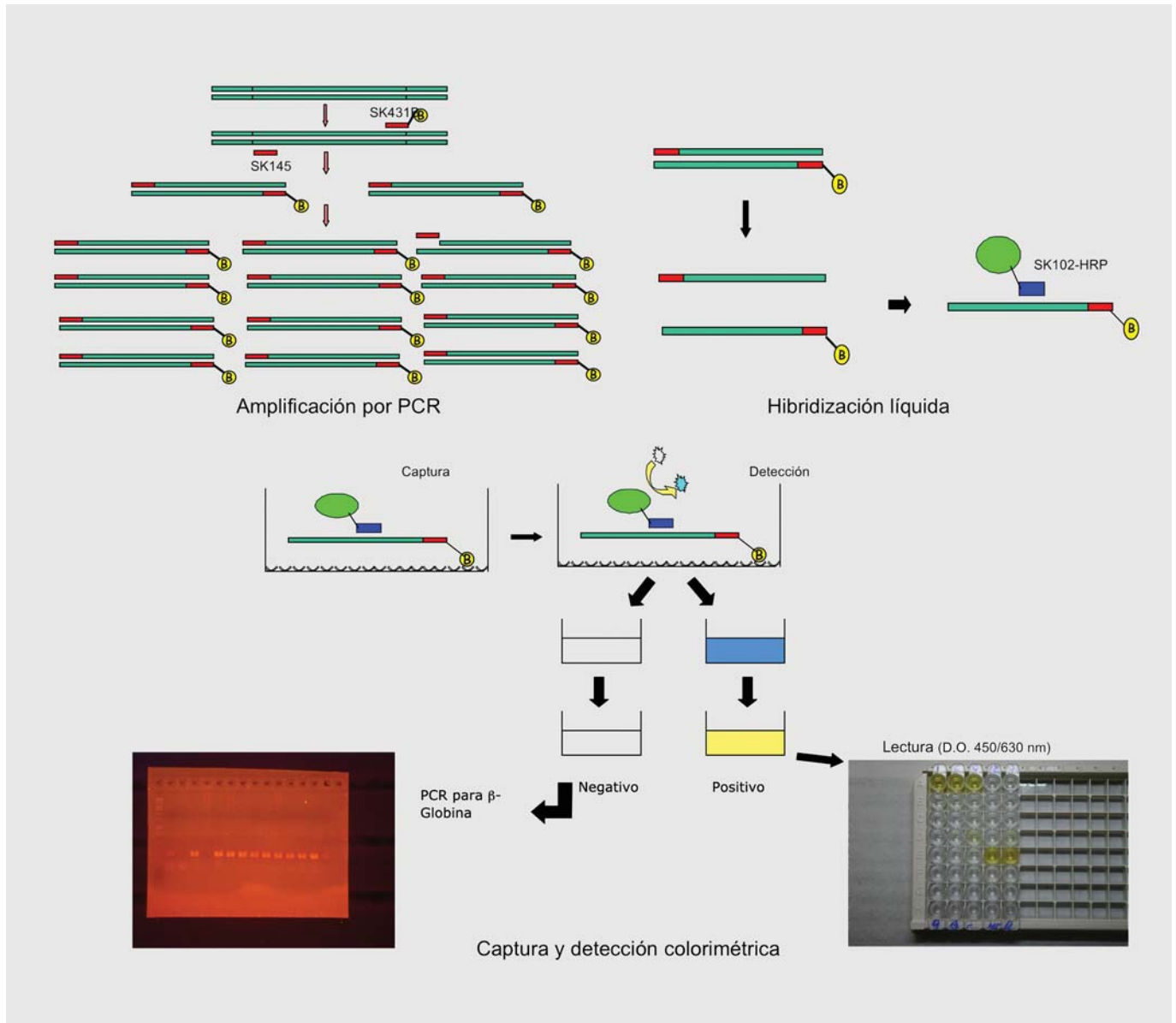
Amplificación por PCR de un fragmento altamente conservado del gen *gag* de VIH-1, con posterior hibridización líquida de los productos amplificados a una sonda marcada con peroxidasa. El híbrido es luego detectado colorimétricamente en microplaca con formato ELISA

(Figura 1). El método incluye controles plasmídicos para la validación de cada ensayo.

#### Muestras clínicas

Se evaluaron 648 muestras (357 infectadas y 291 no infectadas por VIH-1) representativas de diferentes poblaciones como adultos de bajo y alto riesgo para la infección, embarazadas, dadores de sangre, homosexuales, trabajadoras sexuales, individuos heterosexuales con parejas múltiples, drogadictos endovenosos, hemodializados, niños menores a 18 meses hijos de madres infectadas por VIH-1, individuos con coinfección (VIH/VHC y VIH/VHB) e individuos con otras patologías infecciosas y no infecciosas.

Figura 1



## Resultados

### Evaluación de la *performance* del método desarrollado

- Valor de corte o *cut off*:

Fue determinado empíricamente de forma tal que permita discriminar las muestras infectadas de las no infectadas por VIH-1 en forma correcta (Figura 2). Se definió como:

$$\text{Cut off} = \text{D.O. del CN} + 0,200$$

Dicho valor fue luego verificado con los estudios de *performance* realizados y mediante la construcción de la curva ROC correspondiente (Figura 3).

- Sensibilidad Analítica:

Se utilizaron diluciones seriadas del plásmido pHIV<sub>gag</sub>, estimándose un límite de detección para el método correspondiente a 9 copias ADN/reacción (Figura 4).

- Sensibilidad Clínica y

- Especificidad Total:

Se calcularon con el programa Epidat 3.0 a partir de la evaluación de 600 muestras clínicas (354 infectadas y 246 no infectadas por VIH-1). Se obtuvo una sensibilidad clínica de 98,87% [IC (95%): 98,72-99,02] y una especificidad total de 98,78% [IC (95%): 98,57-98,99] (Figura 5, pág. 4).

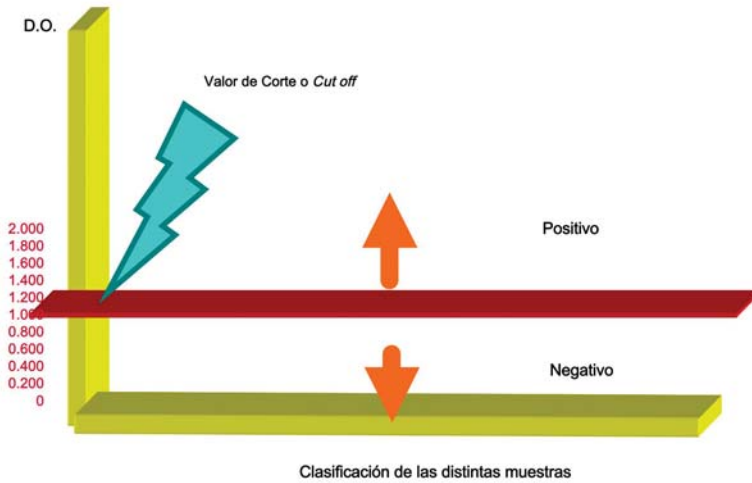
El ensayo no presentó problemas para el

diagnóstico diferencial de 35 muestras VIH-1 negativas con otras patologías infecciosas y no infecciosas. Tampoco se observó interferencia endógena con metabolitos como bilirrubina, triglicéridos y hemoglobina, estudiados en concentraciones patológicas.

- Otros parámetros de *performance* evaluados:

El Índice de Youden (IJ) dio un valor de 0,98 reflejando las bajas tasas de falsos positivos presentada por el método diagnóstico en evaluación. Las Razones de Verosimilitud Positiva y Negativa fueron respectivamente 81,07 [IC (95%): 80,52-81,63] y 0,01 [IC (95%): 0,01-0,01] (Figura

Figura 2

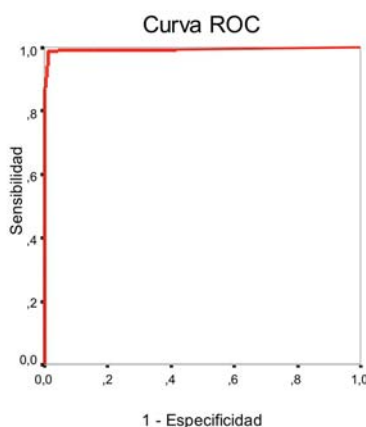


ra 5, pág. 4), indicando que el método favorece tanto la detección de muestras infectadas como no infectadas por VIH-1, por lo que presentó significación clínica.

• Análisis ROC:

Se construyó la curva utilizando el programa SPSS 11.5 (Figura 3), la cual muestra el espectro completo de la *performance* del método, indicando la gran exactitud diagnóstica del mismo. En base a los resultados generados por el programa, se obtuvo que cuando el valor de la constante que interviene en la fórmula del *Cut off*, está comprendido entre 0,170 y 0,206, la sensibilidad y especificidad del método toman sus máximos valores, lo que permite verificar que el valor elegido empíricamente de 0,200 es adecuado.

Figura 3



• Diagrama de dispersión:

Se construyó utilizando el programa Microsoft Excel 2002, representando los valores de D.O. obtenidos con el método al analizar las muestras infectadas y no infectadas por VIH-1 (Figura 6, pág. 4). El mismo permite observar que el valor de 0,200 elegido para el cálculo del *Cut off*, es adecuado desde el punto de vista analítico.

• Valores Predictivos:

Se calcularon utilizando el Teorema de Bayes teniendo en cuenta la prevalencia de la enfermedad en la población donde se aplicará el método. El Valor Predictivo Positivo (VPP) fue de 36,4% [IC (95%): 31,4-41,4] y el Valor Predictivo Negativo (VPN) fue de 99,9% [IC (95%): 99,5-100,3].

• Reproducibilidad:

El coeficiente de variación (CV) inter-ensayo del método en evaluación fue 9,3% para 12,5 copias ADN/reacción (cercano al Límite de Detección).

Conclusiones

El método desarrollado para la detección de secuencias de ADN de VIH-1 en células mononucleares de sangre periférica, resultó útil para el diagnóstico de la infección por este virus en las diferentes poblaciones analizadas, presentando parámetros aceptables que caracterizan su validez, seguridad y precisión. Es un método de bajo costo para su implementación en la rutina del laboratorio microbiológico, que no requiere instrumental costoso y es de fácil operatividad. El desarrollo de herramientas diagnósticas con tecnología local, asegura la disponibilidad continua de productos biotecnológicos, evitando además el uso de técnicas caseras que carecen de la suficiente estandarización y validación.

Bibliografía

- McDermott JL, et al. (1999). J Clin Microbiol 37(7):2361-5.
- Gariglio RC, et al. (2004). Medicina 64: 419-28.
- Madej RM, et al. (2004). MM14-P, NCCLS 24(27).
- Bottasso O. (2002). Lo esencial en investigación clínica. 1ªed, Homo Sapiens

Figura 4

Diluciones del pHIVgag	Nº copias de ADN/reacción	Resultado al aplicar el método diagnóstico
10 <sup>-6</sup>	9 x 10 <sup>5</sup>	P (>3,000 - >3,000/0,215)
10 <sup>-7</sup>	9 x 10 <sup>4</sup>	P (>3,000 - >3,000/0,215)
10 <sup>-8</sup>	9090	P (2,605 - 2,783/0,215)
10 <sup>-9</sup>	909	P (1,238 - 1,611/0,215)
10 <sup>-10</sup>	90	P (0,729 - 0,560/0,215)
10 <sup>-11</sup>	9	P (0,268 - 0,382/0,215)
10 <sup>-12</sup>	0,9	N (0,005 - 0,005/0,215)

Figura 5

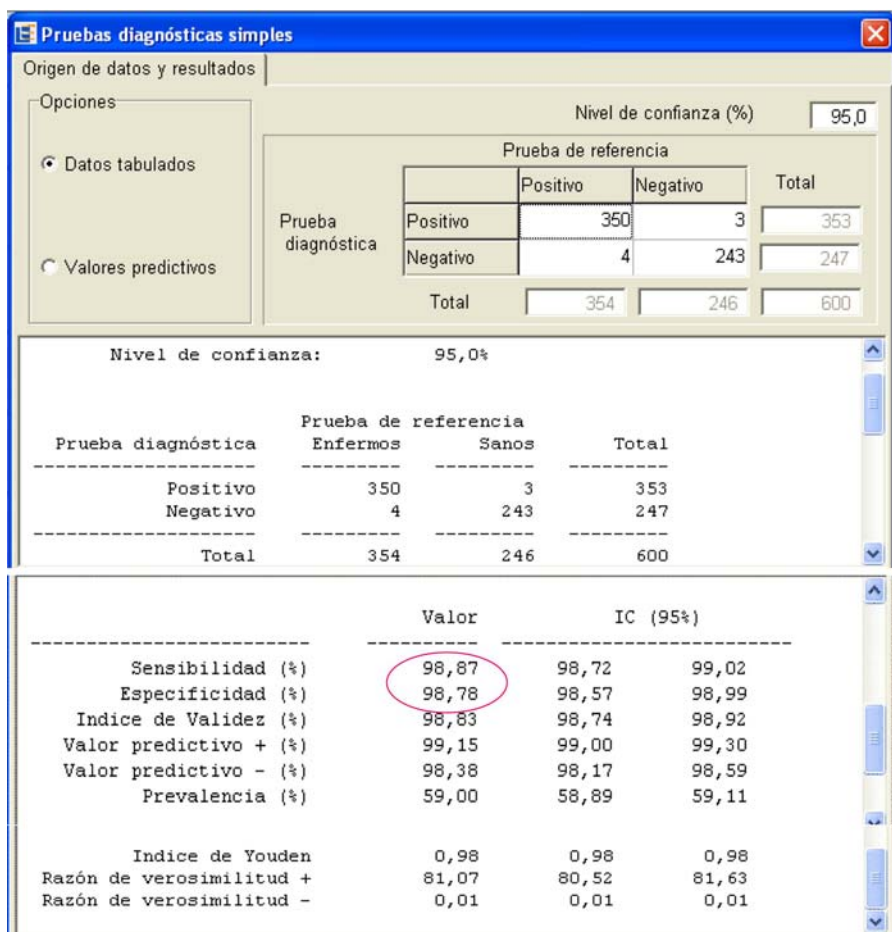
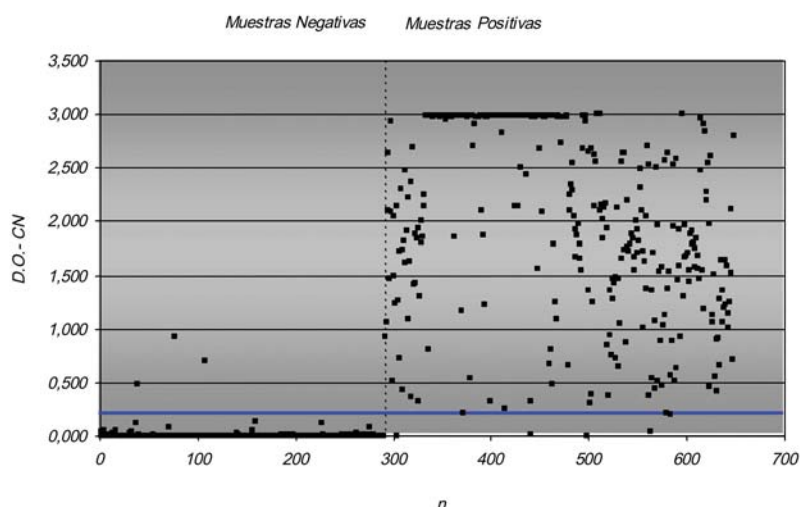


Figura 6



## Agenda de Congresos

### Argentina

- ✓ II Jornadas de Medicina Transfusional de la Región de Salto Grande

Concordia, Entre Ríos

9 y 10 de Noviembre de 2007

Organiza / Informes

ACOPRECAA

acopreca@gmail.com

- ✓ I° Congreso Bioquímico del Sudeste Bonaerense

Hotel Sheraton

Mar del Plata,

22 al 24 de Noviembre de 2007

Organiza / Informes

Centro de Bioquímicos IX Distrito

Tel +54 223 492-0318 / 0319

www.bioquimicos2007mdp.com.ar

cenbio@speedy.com.ar

### Panamá

- ✓ XVIII Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica

IX Congreso del Colegio Nacional de Laboratoristas (CONALAC)

IV Congreso de Estudiantes de Tecnología Médica de la Universidad de Panamá

(CICETMUP)

Panamá, 28-30 de Noviembre y

1 de Diciembre de 2007

Organiza / Informes

COLABIOCLI

www.colabiocli.org

### Chile

- ✓ VI Jornadas Sociedad Médica Laboratorio Clínico

Hotel Radisson Santiago

Santiago, 30 de Noviembre de 2007

Organiza / Informes

Sociedad Médica Laboratorio

Clínico y ADIAG AG

www.adiag.cl