

2014  
Tiene Taja

## OPTIMIZACION DE LA TECNICA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTER BLOT) para la confirmación de la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en Panamá\*

Juan M. Pascale B<sup>1</sup>, Elvira de Austin<sup>2</sup>, Nora O. de Moreno<sup>1</sup>, Carmen Ledezma<sup>2</sup>, Edda de Márquez<sup>2</sup>,  
Rolando Blanco<sup>2</sup>, Evelia Quiroz<sup>1</sup>, Jorge Calzada<sup>1</sup>,  
Ana Raquel Vincensini<sup>1</sup>, Mario C. de Martín<sup>1</sup> y Luis Julio<sup>2</sup>

Sección de Inmunología, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá<sup>1</sup>, Sección de Inmunoserología, Laboratorio Central de Salud del Ministerio de Salud<sup>2</sup>.

La razón del presente estudio es informar el resultado de nuestra investigación para implementar la técnica de Western Blot (WB UP-LCS) en el diagnóstico de la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VI-1). Con tal objeto, separamos las proteínas del VIH-1 mediante electroforesis con base en su peso molecular, en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) durante 3 horas a 200 voltios. Posteriormente, electro-transferimos estas proteínas a papel de nitrocelulosa, durante 4 horas a 200 miliamperios, con la ayuda

de un sistema de enfriamiento externo. Las tiras de nitrocelulosa fueron evaluadas considerando el tiempo de incubación (1 y 16 horas), dos conjugados (anti Ig G humana con peroxidasa y anti Ig G humana con biotina más estreptavidina con peroxidasa) y dos diluciones del suero de los pacientes (1/50 y 1/100). Los resultados que obtuvimos nos permiten decir, en primer lugar, que la condición óptima de la prueba incluye una dilución 1/100 del suero del paciente, la incubación del suero por 16 horas y el uso del conjugado anti

\* Presentado para publicación en marzo de 1994.

Ig G humana con biotina y estreptavidina con peroxidasa; en segundo lugar, que la reactividad inmunológica contra las proteínas p24 y gp160/120 es el criterio diagnóstico más importante para la confirmación de la infección por el VIH-1; y que obtuvimos un 100% de correlación diagnóstica, a un costo entre 5 y 7 veces menor, al compararlo con el sistema comercial.

El objeto de este trabajo es informar los resultados obtenidos para la optimización de la técnica de Western Blot (WB) en la detección de la infección por el VIH-1 a fin de comparar su eficiencia con los diferentes sistemas comerciales conocidos.

## Materiales y métodos

**Antígeno viral (VIH-1).** El antígeno viral utilizado consistió en un lisado del VIH tipo 1 inactivado con luz ultravioleta y tratado con Nonidet P-40 el cual fue gentilmente suministrado por Louisiana State University International Center for Medical Research and Training (LSU-ICMRT) en San José, Costa Rica, a través de su directora Dra. Kirsten Visona.

**Suero de pacientes.** Para la optimización de la técnica utilizamos controles comerciales (positivos y negativos) y sueros conocidos

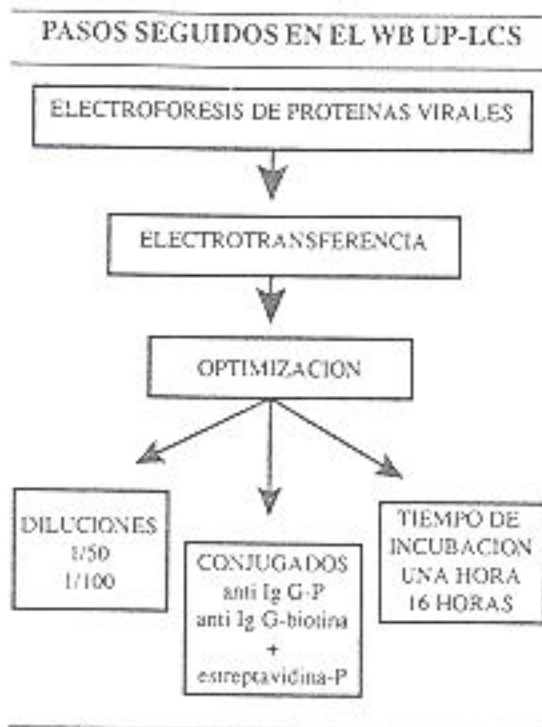
en cuanto a su reactividad frente al VIH-1 (positivos, indeterminados y negativos). Para la comparación del WB comercial (Dupont) con el realizado en Panamá (WB UP-LCS) utilizamos suero de 27 pacientes con reactividad probada por ELISA.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Usamos un sistema vertical de electroforesis (1mm de espesor) siguiendo el método descrito por Laemmli (1) con un gel separador al 11% y un gel concentrador al 4.5%. El VIH inactivado fue mezclado a partes iguales con amortiguador de muestra (2% SDS, 0.5M Mercaptoetanol, 0.5M Tris-HCL, pH 6.8) y calentado por 5 minutos a 60°C. La corrida electroforética se llevó a cabo por 3 horas, a 200 voltios y a temperatura ambiente. Un fragmento del gel fue cortado y teñido con Azul de Coomassie para determinar el número e intensidad de las proteínas separadas (Fig. No. 1).

Inmunoelectrotransferencia (WB). Las proteínas virales, una vez separadas electroforéticamente, fueron transferidas a una matriz de NT, con un poro de 0.45 µm, usando el sistema húmedo de electro-transferencia descrito por Towbin (2) y adaptado por Tsang para el VIH (3). Usamos corriente constante de 200 miliamperios por 4 horas, con un sistema externo de enfriamiento del amortiguador de transferencia. Para

evaluar la eficiencia del proceso, se tiñó un fragmento de la NT con un sistema de detección para proteínas (Amidoblack) y se comparó con lo observado en el gel de poliacrilamida.

FIGURA NO. 1



Detección inmunoenzimática (4, 5). Para la optimización de la técnica comparamos diferentes parámetros, como la dilución de los sueros a 1/50 y 1/100; el tiempo de incubación, una hora y toda la noche (16 horas); y los conjugados usados (anti-IgG humana con peroxidasa y anti-IgG humana con biotina más estreptavidina con peroxidasa). Secuencialmente realizamos la incubación, a temperatura ambiente y con agitación constante, de las tiras de NT con los sueros diluidos en PBS-Tween 20 con leche decremada al 5%; tres lavados

de las tiras con PBS-Tween 20; incubación a temperatura ambiente y agitación constante de las tiras de NT con los diferentes conjugados, a diferentes tiempos; tres lavados de las tiras con PBS-Tween 20; aplicación del sustrato (peróxido de hidrógeno) y cromógeno (4-Cl-1-Naftol) e incubación por 10 a 15 minutos con agitación constante hasta la aparición de las bandas coloreadas; aspiración del cromógeno y un lavado de las tiras en agua destilada.

El suero de los pacientes y los controles comerciales fueron manejados siguiendo las normas de bioseguridad recomendadas por la OMS (6). Los materiales usados fueron desechados, previa descontaminación en autoclave y/o con hipoclorito de sodio al 5%.

Interpretación de los resultados (7, 8). Las proteínas virales con significado diagnóstico en el WB para el VIH-1 son: p24, gp41 y gp120/160. Para evaluar la reactividad de las tiras de WB UP-LCS, cada vez que se corrió la prueba, utilizamos controles comerciales: positivo alto, positivo bajo y negativo.

Los resultados de la prueba de WB se interpretaron como positivos, indeterminados o negativos (Tabla No. 1).

**TABLA No. 1**

Correlación de los resultados obtenidos con el WB UP-LCS y el WB comercial

Interpretación *	WB UP-LCS	WB comercial
Positivos	19	19
Indeterminados	3	3
Negativos	5	5
Total	27	27

\* Ver los criterios de positividad en Materiales y métodos.

## Resultados

Fueron clasificados considerando la optimización de la técnica (Fig. No. 1 y Fig. No. 2) y la correlación obtenida al comparar el WB UP-LCS con los sistemas comerciales (Tabla No. 1 y Fig. No. 3).

**Dilución.** Observamos una mayor intensidad de la reacción con la dilución 1/50; pero como produce

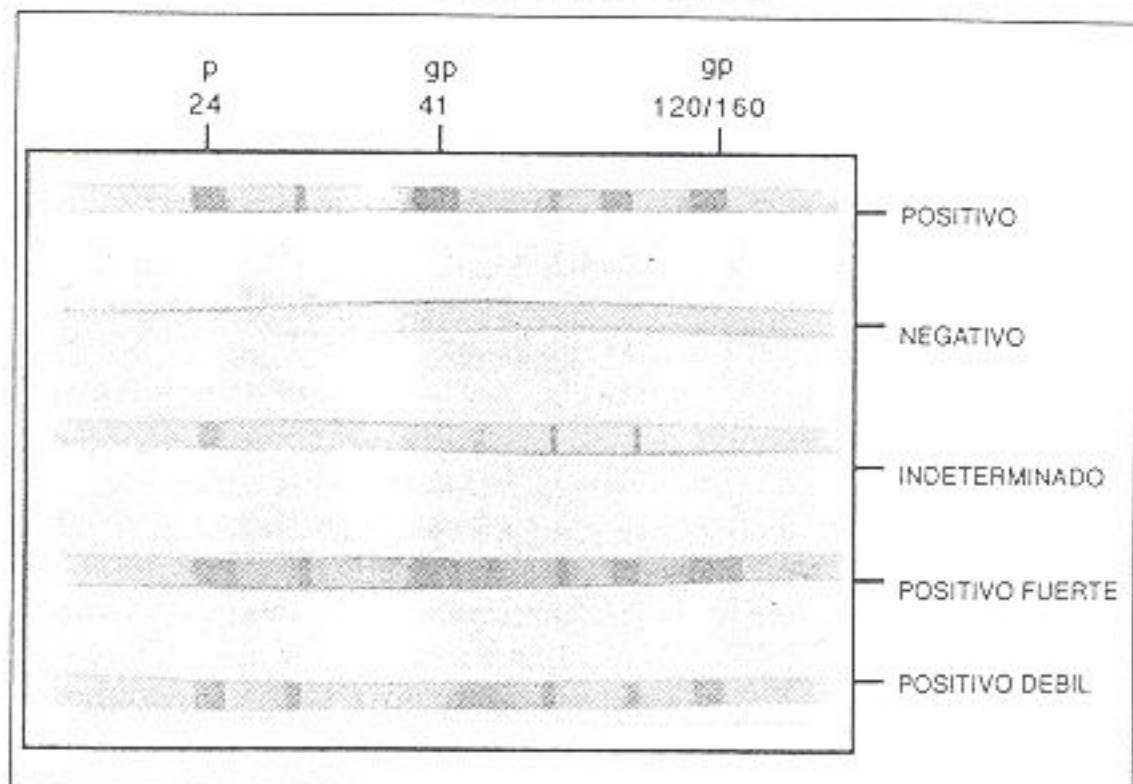
mucha reactividad de fondo (background) en los sueros con títulos altos es preferible usar, en esos casos, la dilución 1/100.

**Conjugados.** El sistema anti-IgG humana más estreptavidina con peroxidasa demostró ser más sensible al incubarlo por una hora.

**Incubación.** La incubación de las muestras durante toda la noche demostró ser superior a la incubación de una hora cuando se usó el conjugado anti-IgG humana con peroxidasa y el suero no tenía un título muy alto. La incubación de una hora es adecuada para sueros con títulos altos y cuando se usa anti-IgG con biotina más estreptavidina con peroxidasa, como sistema de detección.

**Correlación.** Obtuvimos un 100% de correlación diagnóstica

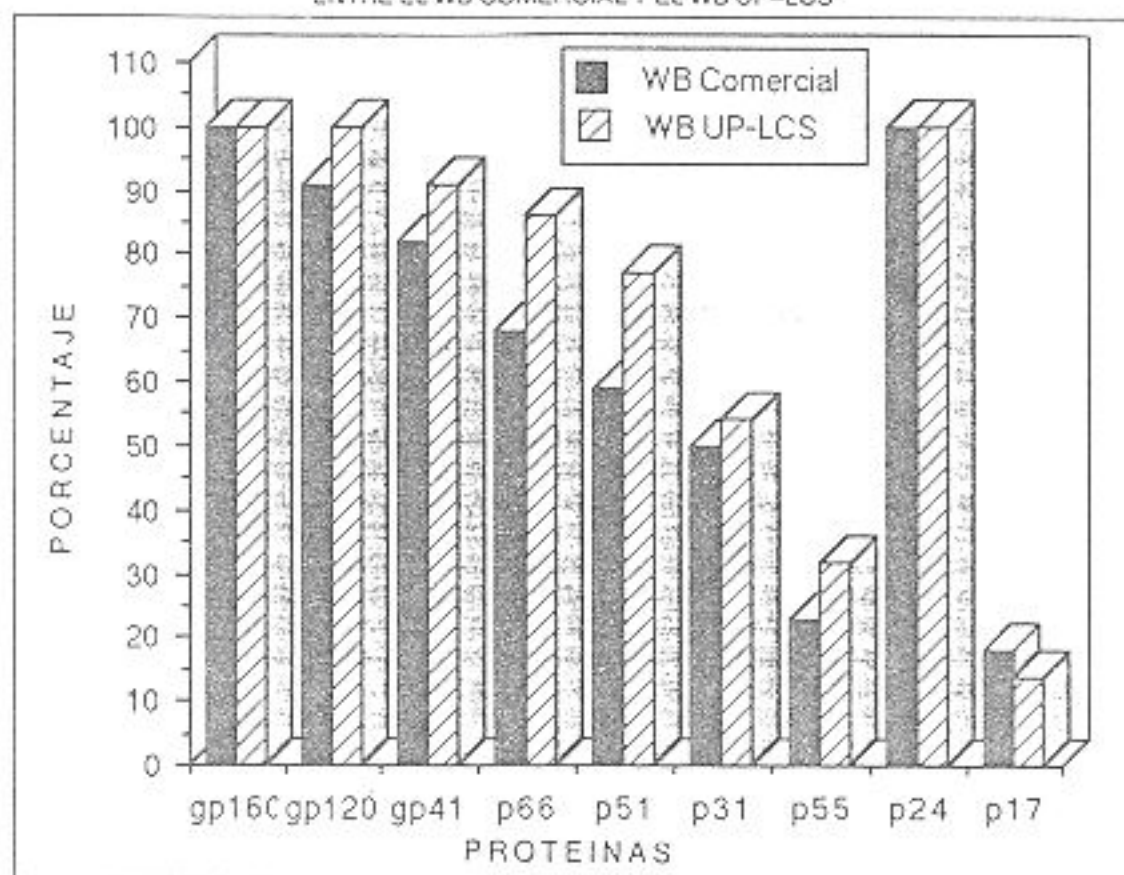
**FIG 2**  
WESTERN BLOT UP-LCS



(Tabla No. 1) entre el WB UP-LCS y el WB comercial. Observamos la importancia de las proteínas p24 y gp120/160 (Fig. No. 3) como requisitos indispensables para la confirmación diagnóstica de la infección por el VIH-1.

realizar todo el proceso metodológico necesario para la producción de las tiras de nitrocelulosa con las proteínas virales; y a la poca disponibilidad de los reactivos y equipos que se requieren para desarrollar la prueba.

FIG. 3  
PORCENTAJE DE REACTIVIDAD COMPARATIVA  
ENTRE EL WB COMERCIAL Y EL WB UP-LCS



### Comentarios

El WB es una de las técnicas confirmatorias más usadas a nivel mundial por su elevada especificidad (9). En países como Panamá, en vías de desarrollo, esta metodología no es fácil de realizar rutinariamente debido al elevado costo de los sistemas comerciales en el mercado (entre 600 a 1200 Balboas por juego comercial para 30 pruebas); a la escasez de personal capacitado para

Para el desarrollo completo de la prueba de WB practicamos la electroforesis de las proteínas del VIH en geles de poliácridamida SDS (SDS-PAGE), por que nos permite la separación de las proteínas virales según su peso molecular; la electrotransferencia de las proteínas virales a papel de nitrocelulosa (NT), por que fija las proteínas separadas con la técnica anterior a una matriz sólida y permite la incubación posterior con el suero del paciente; y la optimización en la

detección inmunoenzimática de reactividad a las diferentes fracciones proteicas presentes en la NT, porque permite detectar, con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas unido a una enzima específica, la presencia de anticuerpos presentes en el suero del paciente contra determinadas proteínas virales.

Los resultados preliminares obtenidos nos permiten afirmar que la incubación de los sueros durante toda la noche produce mejores resultados, especialmente en sueros con título bajos; que el conjugado anti-IgG humana con biotina más estreptavidina con peroxidasa es el sistema de detección más sensible y de mejor resolución; y que la dilución de suero recomendada es 1/100, excepto en los casos de pacientes con ELISA limítrofe (en este caso se recomienda una dilución 1/50 y la incubación durante toda la noche).

Este trabajo demuestra que la reactividad contra las proteínas p24 y gp120/160 es el criterio de mayor validez para la confirmación del diagnóstico de infección con el VIH-1.

La diferencia observada entre el WB UP-LCS y el WB comercial puede deberse, en cuanto al reconocimiento inmunológico de otras proteínas virales, a variables dependientes del origen y de la concentración del antígeno viral utilizado en la electroforesis.

### Summary

The purpose of this study is to report the results of the Authors'

investigation to apply the Western Blot technique (WB UP-LCS) in the diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) infection. To do this, the Authors separated the proteins of the HIV-1 virus by electrophoresis, based on their molecular weight, in polyacilamide gel with SDS (SDS-PAGE) during 3 hours at 200 volts. Then they electrotransferred these proteins to nitrocellulose paper during four hours at 200 milliamperes, with the aid of external cooling. The nitrocellulose strips were evaluated considering the incubation time (1 and 16 hours), two conjugates (human anti IgG with Peroxidase and human anti IgG Biotin plus Streptavidine with Peroxidase) and two dilutions of the patients' sera (1/50 and 1/100). Based on their results the Authors conclude that, in the first place, the optimal conditions for the test include a dilution of 1/100 of the patients serum, incubation of the serum for 16 hours and the use of the conjugate of anti human IgG with Biotin and Streptavidine with Peroxidase; secondary, that the immunologic reactivity against proteins p24 and gp 160/120 is the most important diagnostic criterion for the confirmation of infection with HIV-1 and that they obtained a diagnostic correlation of 100% at a cost which was 5 to 7 times less than that of the commercial system.

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Dra. Kirsten Visona del ICMRT-LSU, San José, Costa Rica por la amable donación del VIH-1 utilizado en este estudio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 (5259): 680-685
2. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76 (9): 4350 - 4354
3. Tsang VCW, Boyer AE, Pau CP: Enzyme Linked Immunoelctrotransfer Blot Technique (Wester Blot) for Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Antibodies, Procedure Guide, 2ed, Centers for Disease Control, USA, Immunology 1991, pp 1 - 41
4. Biotech/Dupont HIV-1: Western Blot Kit for detection of antibodies to HIV-1, Biotech Reasearch Laboratories Inc, Rockville, Maryland, USA, 1989, pp 1 - 23
5. Cambridge Bioitech HIV-1: Western Blot Kit foe detection of antibodies to HIV-1, Cambridge Biotech Corporation, Worcester, MA, USA, Rev A, 1992, pp 1 - 23
6. OMS: Normas de Bioseguridad para Laboratorios de Diagnóstico e Investigación que trabajan con el VIH, 1992, pp 1 - 29
7. CDC: Interpretation and use of the Western Blot Assay for serodiagnosis of Human Immunodeficiency virus type 1 infections. *MMWR* 1989; 38 (S 7): 1 - 7
8. Celum CL, Coombs RW, Lafferty W, et al: Indeterminate human immunideficiency virus type 1 Western Blots: seroconversion risk, specificity of suplemental tests, and an algorithm for evaluation. *J Infect Dis* 1991; 164 (4): 656 - 664
9. Vega SA, Pascale JM: SIDA: diagnóstico de laboratorio. *Rev Med Cient Panama* 1991; 6 (1): 8 - 13