

24/66

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

" DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA  
EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA  
POR EL METODO DE ELISA "

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A

MARIA PATRICIA MARTINEZ HERNANDEZ



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1989.



## **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 está 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.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCION	7
OBJETIVO	10
2. GENERALIDADES	
2.1. Epidemiología	11
2.2. Cuadro clínico - Diagnóstico	12
3. CARACTERISTICAS DEL AGENTE CAUSAL	
3.1. Estructura	20
3.2. Mecanismo de infección	22
4. METODOS PARA LA DETECCION DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS	
4.1. Análisis inmunoenzimático ELISA	32
4.2. Técnica de inmunofluorescencia	34
4.3. Radioinmunoanálisis	37
4.4. Inmunoelctrotransferencia (método Western blot)	38
5. PARTE EXPERIMENTAL	
5.1. Material y método	41
5.1.1. Equipo	41
5.1.2. Material biológico	43
5.1.3. Procedimiento de ensayo	45
5.2. Cálculos	50
5.3. Criterios	52
6. RESULTADOS	53
7. DISCUSION Y COMENTARIOS	57
BIBLIOGRAFIA	60

## 1. INTRODUCCION

El síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA) es una nueva entidad nosológica cuya incidencia en el mundo se incrementa constantemente desde los inicios de la presente década (3). Debido a su fácil diseminación, elevado índice de mortalidad y, hasta el momento, a la ausencia de tratamiento se le considera un problema de salud pública. Esta enfermedad cobra cada vez mayor importancia en la medida que se reporta la aparición de nuevos casos en todo el mundo, por lo que es objeto de intensas investigaciones a partir de 1981, fecha en la que se describió por vez primera como tal en el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de Norteamérica (9).

A partir de 1982 aparecen los primeros reportes que señalan al virus linfotrópico de las células T humanas tipo III (HTLV III) como al agente causal de este síndrome (18); debido a las controversias que surgen con respecto al nombre que habría de llevar el virus, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus sugiere nombrarlo "virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)" de manera transitoria hasta la designación de un nombre oficial (21).

En el presente trabajo se utilizará el término VIH para hacer referencia del virus.

Los datos epidemiológicos sugieren que el síndrome es transmitido horizontalmente por contacto íntimo, vía transplacentaria, productos sanguíneos, así como también una posible predisposición genética en algunos grupos poblacionales; todo esto ha desencadenado problemas de muy diversa índole: científicos, políticos, socio-económicos e inclusive de tipo religioso y filosófico (22). No obstante, el común denominador de todas esas áreas es la preocupación por tratar de detener la diseminación de la enfermedad; la implantación de campañas tendientes a mejorar la educación sexual, los buenos hábitos de la población, un adecuado control de las transfusiones sanguíneas, entre otras, son hasta la fecha el único medio para lograr tal fin (14). La detección y eliminación de unidades de sangre y plasma potencialmente infecciosas para su uso en transfusiones y para la elaboración de derivados inyectables es un método práctico para lograr el control de la transmisión de la enfermedad. Esto se puede conseguir detectando la presencia de anticuerpos contra VIH en tales materiales.

En la presente investigación se utilizó el análisis inmunoadsorbente ligado a enzimas (método inmunoenzimático ELISA) para la

búsqueda de anticuerpos contra VIH. La investigación se llevó a cabo en muestras de suero de grupos de pacientes con infecciones y cánceres del sistema respiratorio, tomadas al azar, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER); así como en muestras de suero de hombres homosexuales, los que se consideran como uno de los grupos con alto riesgo a la enfermedad.

## OBJETIVO

La finalidad de la presente investigación es evaluar la utilidad del método inmunoenzimático ELISA en la detección de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en muestras de suero de pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y de hombres homosexuales.

## 2. GENERALIDADES

### 2.1. EPIDEMIOLOGIA

La razón de utilizar el término de inmunodeficiencia es que el común denominador de los pacientes que padecen este síndrome es el desarrollo de un severo estado de inmunodepresión (1), (2). Dentro de la población mundial se han identificado grupos en los cuales la incidencia de la infección es más elevado, por lo que se les considera como grupos de alto riesgo (3), (4):

1. Homosexuales o bisexuales activos con múltiples compañeros sexuales
2. Consumidores de drogas intravenosas
3. Pacientes politransfundidos
4. Africanos
5. Haitianos
6. Compañeros sexuales e hijos de los individuos incluidos en los grupos anteriores
7. Hemofílicos

La edad a la que se detecta la infección en los pacientes de alto riesgo presenta variaciones dependiendo del grupo al cual



pertenecen: aproximadamente el 50% de los hombres homosexuales se encuentran entre los 30 y 40 años y un 25% entre los 20 y 30; en los consumidores de drogas intravenosas las edades se agrupan estrechamente, un 80% se encuentra entre los 20 y 40 años; los pacientes que requieren de transfusiones sanguíneas frecuentes presentan una edad media de 50 años. Debido a que en Africa la enfermedad se considera endémica se puede presentar a cualquier edad; en los Haitianos la población joven es la más afectada alcanzando una proporción del 50% entre los 20 y 30 años; entre los hemofílicos no se presenta agrupación .

El índice de mortalidad aumenta en proporción directa con el tiempo transcurrido entre la adquisición de la infección y el diagnóstico: cuando la infección se ha padecido menos de un año la mortalidad es aproximadamente del 40%, del 50% al año y del 75% a los dos años (4). En muchas ocasiones no es posible diagnosticar la infección poco tiempo después del contagio puesto que el período de incubación es muy variable, en promedio de unos 5 años.

## 2.2. CUADRO CLINICO - DIAGNOSTICO

Los pacientes infectados con VIH presentan un deterioro selectivo y severo de la respuesta inmune mediada por células, ca\_

racterizado por una linfopenia a expensas de los linfocitos T inductores o con función cooperadora (OKT4<sup>+</sup>), al contrario de las células T supresoras (OKT8<sup>+</sup>) que permanecen casi constantes o aumentadas. Lo anterior provoca una disminución de la relación : células cooperadoras/supresoras, que normalmente es de 2/1 a 1/1 o menos (5). Se ha logrado establecer un cuadro inmunológico básico entre los pacientes con SIDA, caracterizado por (6):

1. Disminución de la relación linfocitos T cooperadores/supresores
2. Niveles elevados de gamma-globulinas, específicamente clases G, A y M
3. Disminución de la relación linfocítica contra antígenos, mitógenos y aloantígenos
4. Ausencia de hipersensibilidad de tipo retardado a las pruebas de sensibilidad cutánea (PPD, candidina, histoplasmina, entre otras)
5. Adenopatía generalizada con hiperplasia folicular

Puesto que los linfocitos T son las células blancas que actúan principalmente contra algunos parásitos, virus y hongos, este desorden conduce a la adquisición de infecciones graves causadas por microorganismos oportunistas que incluyen a miembros de los grupos protozoos, helmintos, hongos, algunos virus y bacte

rias. A continuación se mencionan las enfermedades más comunmente asociadas con el SIDA (7), (8):

1. Neumonía por *Pneumocystis carinii* (NPC)
2. Neumonía, encefalitis o meningitis debida a uno o más de los siguientes agentes transmisibles:

<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>
<i>Nocardia sp</i>	Citomegalovirus
<i>Criptococcus neoformans</i>	Micobacterias atípicas
3. Esofagitis por:

<i>Candida albicans</i>	Virus del herpes simple
Citomegalovirus	Virus de Epstein-Barr
4. Enterocolitis crónica por *Criptosporidium enteritis*
5. Herpes simple mucocutáneo con diseminación

De los padecimientos anteriores el más común es la NPC, que se acompaña en más de la mitad de los casos con alguna neoplasia del tipo del sarcoma de Kaposi (SK) o linfoma no Hodgkin, como el linfoma tipo Burkitt y el inmunoblástico entre otros. También se han reportado los linfomas de las células B y los linfomas primarios del sistema nervioso central. En el Centro para el Control de Enfermedades se ha reportado NPC en más del 50% de los enfermos de SIDA, SK sin NPC en el 25% y presencia de SK y NPC

simultáneas en menos del 10% (9), (10). Antes de 1981, el sarcoma de Kaposi y las enfermedades oportunistas se observaban principalmente en pacientes con sistemas de inmunidad suprimidos por quimioterapia, como en el caso de postransplantes, cáncer, entre otras. El sarcoma de Kaposi es la neoplasia más frecuentemente asociada con el SIDA, caracterizado por lesiones cutáneas maculopapulares o nodulares, ovoidales, rosa pálido a violáceas, no dolorosas, ni pruriginosas; las lesiones habitualmente son múltiples, bilateralmente simétricas, localizándose en cualquier parte de la superficie corporal principalmente en extremidades, tronco y cabeza (11). Antes de la descripción del síndrome se presentaba generalmente en los varones de más de 40 años del oriente de Europa (12). Por otra parte, se le considera endémico entre los hombres jóvenes y de edad media de Africa ecuatorial, en donde algunos autores como Montagnier y Gallo, entre otros, piensan se originó el SIDA (13), (14).

Los síntomas son muy variados, dependiendo del alcance de la inmunodepresión y de la adquisición de una o más infecciones de tipo oportunista. En general, el cuadro clínico manifiesto es un tanto evidente, existiendo antecedentes de fiebre, pérdida de peso, infecciones respiratorias repetidas, en ocasiones cuadros diarreicos recurrentes, aparición de linfadenomegalia de predo

minio cervical, padecimiento de múltiples enfermedades venéreas, entre otros. En resumen, la presencia de uno o más de los síntomas siguientes puede indicar un diagnóstico afirmativo, en especial en personas que pertenezcan a alguno de los grupos de alto riesgo y/o manifiesten presencia de anticuerpos contra VIH (10), (15):

1. Fatiga inexplicable y persistente
2. Tríada del "síndrome de emancipación": linfadenopatía, pérdida de peso y fiebre
3. Lesiones cutáneas
4. Tos persistente
5. Diarreas recurrentes
6. Contusiones o hemorragias
7. Lesiones bucales blanquesinas
8. Datos neurológicos y psiquiátricos que indiquen daño al sistema nervioso central
9. Signos oftálmicos que indiquen daño al sistema nervioso central

Por otra parte, la presentación clínica del SIDA no es igual en todos los pacientes, algunos autores (8) han reportado la siguiente agrupación:

1. Homosexuales con linfadenopatía crónica (SIDA pródrómo)

2. Pacientes con SIDA asociado a infecciones oportunistas
3. Pacientes con SIDA asociado a sarcoma de Kaposi
4. Pacientes con síndrome atenuado o de resistencia (preSIDA)

En los pacientes que pertenecen al último grupo el curso de la enfermedad es benigno y las alteraciones inmunológicas semejantes, pero más leves, a los afectados por el SIDA y se considera que só lo un 10-15% de los afectados evolucionará a la forma clínica.

Hasta ahora el diagnóstico del SIDA es en gran medida clínico, basado en la historia médica, sexual, estilo de vida, así como en los exámenes de laboratorio del paciente; la historia médica es además de gran ayuda para la identificación de grupos de alto riesgo a la enfermedad. Existen varias técnicas inmunosero-lógicas (descritas más adelante) utilizadas para mostrar evidencia de anticuerpos específicos contra VIH en el material biológico de las personas sospechosas de padecer SIDA, pero esto no es suficiente para establecer un diagnóstico definitivo de la enfermedad. Es necesario efectuar una evaluación clínica y de laboratorio más exhaustiva para poder llegar a un diagnóstico definitivo.

A continuación se mencionan las pruebas de laboratorio más frecuentemente utilizadas para apoyar un diagnóstico de SIDA (16),

(17):

1. Cuenta de células blancas totales
2. Cuenta diferencial
3. Determinación de inmunoglobulinas séricas totales (se pueden utilizar técnicas como la inmonodifusión radial)
4. Cuantificación de linfocitos T y B en sangre periférica (linfocitos formadores de rosetas E y rosetas EAC respectivamente)
5. Determinación de la funcionalidad de los linfocitos T y B (a través de la estimulación con mitógenos, su capacidad para sintetizar ADN, para producir ambos factores el inhibidor de la migración de macrófagos y el activador de macrófagos, entre otros)
6. Evaluación de la relación T4/T8 (mediante la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los marcadores de membrana de las células T)
7. Evaluación de la hipersensibilidad de tipo retardado (mediante la utilización de pruebas de anergia cutánea con antígenos como candidina, toxoide tetánico, estreptocinasa, entre otros)
8. Búsqueda de anticuerpos contra Citomegalovirus, Herpesvirus, Treponema palidum, entre otros
9. Diagnóstico de infecciones de tipo oportunista recurrentes

tes.

No obstante, la presencia de VIH en el material biológico del paciente, demostrada mediante la utilización de técnicas inmunológicas (descritas más adelante) o por la observación microscópica de cortes de tejidos, se considera suficiente para establecer un diagnóstico definitivo de SIDA.



### 3. CARACTERISTICAS DEL AGENTE CAUSAL

#### 3.1. ESTRUCTURA

En el inicio de la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida existía una gran controversia para tratar de explicar su etiología, pero gracias a los datos epidemiológicos y a los trabajos de diversos investigadores (8), (18) se sentaron las bases que señalan a un solo agente infeccioso como al causante de esta enfermedad. Ahora sabemos que el llamado "virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)" es el agente etiológico del SIDA (11). (19). Este virus está clasificado como un Ribovirus, específicamente de la familia de los Retrovirus puesto que su material genético está formado a base de ácido ribonucleico (ARN) y junto con éste lleva una enzima llamada transcriptasa reversa.

Gracias a los trabajos de diversos investigadores (20), (21) ahora se sabe que la partícula viral de VIH está formada por las siguientes estructuras (ver figura 1):

1. Envoltura proteica
2. Cápside
3. Nucleoide

La envoltura del virus consiste de una bicapa de lípidos, atrave\_

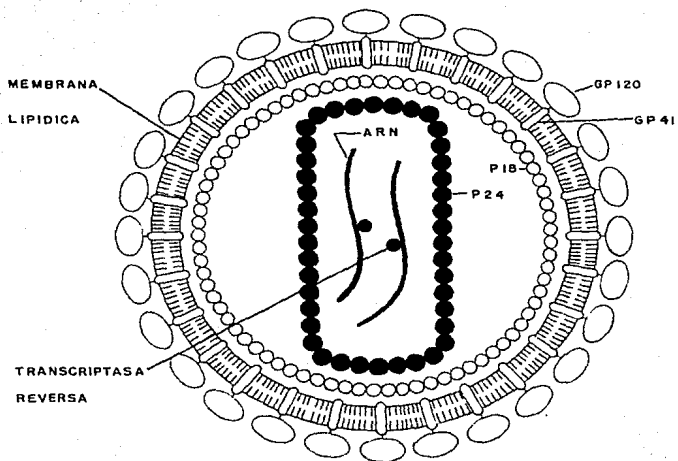


FIGURA 1. Esquema de un virion del VIH.

sada por glicoproteínas formadas por dos subunidades llamadas gp41 y gp120. El cápside está formado por dos capas de proteínas conocidas como p24 y p18. Por último, el nucleocido consiste de filamentos de ARN y de varias moléculas de la enzima transcriptasa reversa, la cual tiene un elevado peso molecular (aproximadamente 100,000) y requiere la presencia de  $Mg^{2+}$  para su óptima actividad enzimática.

### 3.2. MECANISMO DE INFECCION

Una vez que una persona es infectada por el virus, las principales células blanco del sistema inmune son los linfocitos T4; Gallo entre otros investigadores explica que esto se debe a la presencia de moléculas o marcadores T4 sobre la membrana externa de dichas células. Estos marcadores son los que definen la categoría de linfocitos T4; existen otras células blancas implicadas en el sistema inmune que poseen en su superficie esos marcadores, aunque en menor cantidad, como los macrófagos y monocitos. Hasei\_tine, del Instituto para el Cáncer Dana Farber, sugiere que "la velocidad de muerte celular es proporcional a la concentración de los marcadores T4 sobre la superficie de la membrana de la célula infectada" (20).

Basándose en los trabajos de Wong-Staal y Fisher entre otros,

y en los propios, Gallo formula las siguientes hipótesis:

1. "La muerte celular depende de una interacción entre la cubierta viral (por medio de las glicoproteínas de la envoltura) y la membrana de la célula huésped"
2. "Para la entrada del virus a la célula es suficiente un nivel bajo del marcador T4, pero se requiere un nivel mayor para el efecto citopático"

Lo anterior explica la destrucción selectiva de los linfocitos T4 sobre las otras células del sistema inmune, como los monocitos y los macrófagos, los cuales aún cuando son infectados por VIH no son destruidos o no en la misma proporción que los primeros. De esta manera, el virus puede penetrar únicamente a ciertos tipos celulares del organismo, esto es, aquellos que tienen lo que se conoce como "proteínas receptoras" en su superficie y que actúan como enlaces químicos para las glicoproteínas. El virus se une primero a los receptores de la célula y después penetra a ella, valiéndose de alguno de los siguientes mecanismos (20):

1. Mediante el proceso conocido como endocitosis mediada por receptores, el cual facilita la entrada a la célula de una gran variedad de moléculas necesarias para su metabolismo normal
2. Fusionando su envoltura con la membrana de la célula blanco

Una vez en el citoplasma, la estructura viral se desintegra liberando su ácido ribonucleico y las moléculas de transcriptasa reversa; esta última transcribe el ARN viral en ácido desoxirribonucleico (ADN). Cuando éste ocurre, el ADN viral penetra al núcleo celular en donde se inserta al genoma propio de la célula, y en este momento se le conoce como provirus; esta es la razón que hace al virus parte permanente de la persona infectada, es decir el virus deja de existir como tal. El provirus espera las señales químicas que induzcan el inicio de su multiplicación.

Puesto que los linfocitos T4 forman una parte importante del sistema inmune, son activados por los antígenos que penetran al organismo. Investigadores como Scott entre otros, proponen que al activarse la célula T4 infectada por VIH también se activan los genes virales latentes; entonces, es posible que la llegada al organismo de otro agente infeccioso o material extraño sea la señal esperada por el provirus para el inicio de la replicación. Repentinamente, la célula T4 infectada empieza a hacer copias de los genes virales en forma de ácido ribonucleico mensajero (ARNm); este intermediario genético viaja fuera del núcleo hacia el citoplasma, en donde promueve la producción de las proteínas que el virus perdió para poder insertarse en el núcleo celular; además, hace copias de los filamentos de ARN viral que

servirán como "corazón" de las nuevas partículas virales.

Dentro de los linfocitos T4 activados, las proteínas y los ARN virales se ensamblan en partículas virales casi completas, que sólo carecen de las membranas lipídicas externas. Las nuevas partículas virales empiezan a "gemar" hacia afuera, desde abajo de las membranas de las células infectadas, rodeándose de fragmentos de la misma, y quedando libres como virus completos. Las partículas neoformadas se diseminan hacia otras células T4 y también podrán infectar otros tipos celulares por todo el organismo, incluyendo células cerebrales y pulmonares.

Sin embargo el efecto crucial de la infección por VIH es la destrucción de las células T4 en las que se multiplica; existen varias hipótesis para tratar de explicar este hecho (21):

1. Scott propone que el virus al empezar a gemar hacia afuera hace agujeros en las membranas de las células infectadas, y debido a que la cantidad de virus que geman es muy grande, las células no pueden reparar los orificios tan rápido como son hechos. De este modo, los componentes vitales de la célula escapan a través de la membrana perforada, lo que hace que la célula no pueda sobrevivir mucho tiempo

2. Gallo propone que los linfocitos T4 dañados son destruídos por otras células del sistema inmune, como por ejemplo los macrófagos

En resumen, la pérdida de linfocitos T4 daña selectivamente al sistema inmune mediado por células lo que deja al organismo muy vulnerable a infecciones. Independientemente de cual de los dos modelos anteriores sea el correcto, la principal pregunta que se hacen los investigadores del SIDA es ¿cómo es capaz el virus de elevar su velocidad de replicación tan rápido desde "cero" hasta un nivel lo suficientemente tan alto para destruir a la célula huésped?. La respuesta probablemente se encuentre en el genoma viral. La forma del genoma viral del VIH es su ADN transcrito a partir del ARN e integrado en los cromosomas de la célula infectada, conocido como provirus, el cual incluye los genes necesarios para codificar los componentes de la partícula viral que se deben expresar para que su replicación se lleve a cabo. El control para la expresión parece consistir en un grupo de genes cuya presencia hace al genoma del VIH mucho más complejo que el de cualquier otro retrovirus conocido.

El material genético de muchos retrovirus consiste principalmente de tres genes que codifican los componentes de la partícula viral:

1. Gen env, que codifica los componentes de la cubierta viral
2. Gen gag, que codifica el "corazón" viral formado a base de ARN
3. Gen pol, que codifica la transcriptasa reversa

Estos tres genes están rodeados por extensiones de ADN llamadas: secuencias repetidas de terminación larga (LTR's) (22), que incluyen secuencias de ADN que tienen un papel en el control de la expresión de los genes virales.

El genoma del VIH, sin embargo, incluye al menos otros cuatro genes que codifican pequeñas proteínas que ayudan a regular la expresión genética (ver figura 2), conocidos como:

1. Gen tat, que tiene una doble función: en primer lugar, al igual que sus análogos en los virus HTLV-I y HTLV-II, parece regular la transcripción del ARNm de los genes virales. Además, afecta los eventos posteriores a la transcripción, tal vez la traducción del ARNm a proteínas
2. Gen trs, que parece controlar el balance entre las diversas formas del ARNm
3. Gen sor, cuyas funciones no están aún bien definidas
4. Gen 3'orf, cuyas funciones no están aún bien definidas



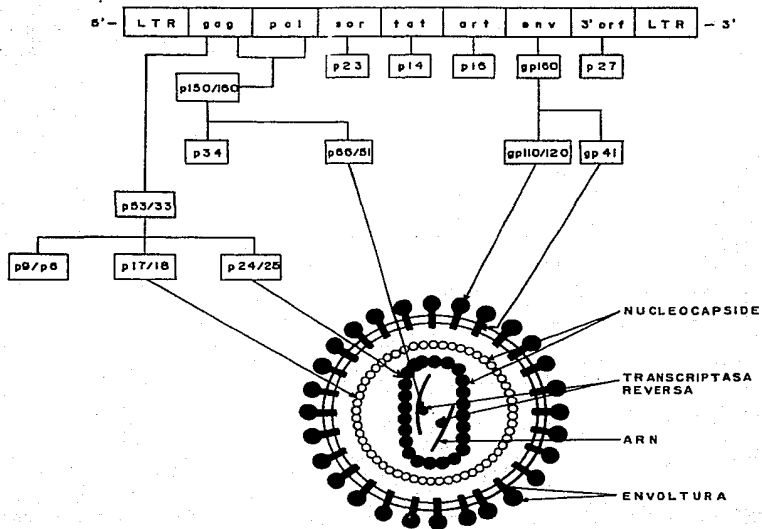


FIGURA 2. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL GENOMA DEL VIH, DE SUS PRODUCTOS Y DE UN VIRION ENSAMBLADO.

No obstante los conocimientos anteriores, todavía no se sabe a ciencia cierta como trabaja el sistema para el control de la replicación viral.

Cada vez es más claro que la deficiencia inmune es solo uno de los efectos causados por VIH; a partir de 1984 los trabajos de investigadores como Shaw, Hahn, Wong-Staal, entre otros, señalan la presencia por primera vez de VIH en tejidos cerebrales y de médula ósea (23). Ya que los monocitos y macrófagos son capaces de atravesar la barrera sanguínea cerebral, la que separa al sistema nervioso central del torrente sanguíneo, es posible que al ser infectados en la sangre transporten al virus de ahí al cerebro. En el cerebro y médula espinal al parecer el virus tiene un efecto patogénico directo que no depende de la deficiencia inmune. Las principales patologías observadas en el cerebro son: una proliferación anormal de las células gliales que rodean a las neuronas, y las lesiones resultantes de la pérdida de materia blanca. No se sabe como es que el virus causa tales cambios anatómicos, ni porque el rango relativamente limitado de las lesiones o aberraciones estructurales debidas al virus dan lugar al amplio rango de síntomas, que incluyen demencia y migraña.

No obstante que los efectos neurológicos del VIH son independientes de la deficiencia inmune, el tercer tipo de patología descrito, el cáncer, tiene una relación ambigua con la incapacidad del sistema inmune. Las personas infectadas con el virus tienen un riesgo incrementado para, al menos, tres tipos de tumores:

1. El sarcoma de Kaposi
2. Los carcinomas, incluyendo el cáncer de piel muchas veces localizado en la boca y recto de los homosexuales infectados
3. Los linfomas de células B, los cuales son tumores en los linfocitos B

En algunos casos los tumores parecen ser independientes de las deficiencias inmunes, como lo sugiere el hecho de que los homosexuales pueden tener un alto riesgo a desarrollar sarcoma de Kaposi aún si no están infectados con el virus (21). Otros patógenos diferentes a VIH, tal vez, los agentes transmisibles por contacto sexual, son susceptibles a ser involucrados en estos tumores; de cualquier manera la infección con VIH aumenta en gran medida el riesgo a desarrollar el sarcoma de Kaposi.

Es posible que la disminución de la respuesta inmune facilite secundariamente la replicación de los agentes causantes de tumores; estos agentes aún no son bien conocidos, pero un probable

candidato es el virus linfotrópico humano B (HBLV), un nuevo miembro de la familia de los Herpesvirus, el cual tiene como material genético ADN y fue recientemente aislado por investigadores como Saki Salahuddin, Dharam Abtashi y Gallo (21).

#### 4. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS

Desde que el virus de la inmunodeficiencia humana es señalado como el agente causal del SIDA, los investigadores se han valido de diversas técnicas inmunológicas para la búsqueda de éste y/o sus anticuerpos en el material biológico (suero, plasma, tejidos) de los pacientes que se sospecha padecen la enfermedad (25), (26). A continuación se mencionan los métodos comunmente reportados por los investigadores del SIDA para mostrar evidencia de infección por VIH.

##### 4.1. ANALISIS INMUNOENZIMÁTICO - ELISA

Comunmente se emplea en la búsqueda de anticuerpos contra VIH en el suero o plasma de pacientes con posible SIDA (27), (28). Este método está basado en la conjugación de una enzima con el antígeno viral; el conjugado tiene actividad enzimática e inmunológica. Virtualmente cualquier enzima puede usarse en este método, mientras cumpla las siguientes características: que sea soluble, estable y esté presente en los líquidos biológicos en cantidades que no interfieran con las determinaciones en el mismo. Entre las enzimas empleadas con mayor frecuencia se encuen

tran la peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, lisozima y glu cosa - 6 - deshidrogenasa. La enzima se acopla a los antígenos o anticuerpos mediante agentes de enlace cruzado, particularmente el glutaraldehído. La peroxidasa de rábano es habitualmente la enzima elegida para acoplarse al antígeno o anticuerpo.

Para la detección de anticuerpos, el antígeno se fija a una fase sólida (como perlas de vidrio o poliestireno, tubos y placas de poliestireno, entre otros), se incuba con el suero de prueba, posteriormente se incuba con una anti-gammaglobulina marcada con la enzima, por último se añade el sustrato para la enzima. La actividad enzimática adherida a la fase sólida se relaciona con la cantidad de anticuerpos ligados. En el siguiente capítulo se describe el método en forma detallada, tal y como fue realizado en este trabajo.

En términos generales, a este método se le atribuyen las ventajas siguientes:

1. Sensibilidad elevada (nanogramos/mililitro)
2. Especificidad satisfactoria
3. Sencillez relativa
4. Estabilidad de reactivos conveniente
5. Ausencia de riesgos a la radiación

## 6. Potencial para su automatización

### 4.2. TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Se considera esencialmente una técnica histoquímica o citológica que se puede utilizar tanto para la búsqueda del virus como de sus anticuerpos en líquidos biológicos o en biopsias de los tejidos del paciente. Se fundamenta en la conjugación de antígenos o anticuerpos específicos con compuestos fluorescentes (fluorocromos); el conjugado resultante posee actividad inmunológica y fluoresce al ser excitado por radiación de longitud de onda apropiada (28), (29).

Existen moléculas que al ser excitadas por una luz de longitud de onda particular, liberan su exceso de energía en forma de luz cuya longitud de onda es mayor que la de la luz usada para excitarlas. Este proceso de excitación-emisión se denomina fluorescencia cuando ocurre en un período de tiempo muy corto ( $10^{-9}$  a  $10^{-8}$  segundos). Los compuestos fluorescentes comúnmente utilizados son: el isotiocianato de fluoresceína y el isotiocianato de tetrametil rodamina, los cuales tienen espectros característicos de absorción y emisión. El isotiocianato de fluoresceína (FITC) se fija con facilidad a las proteínas mediante enlaces covalentes a pH alcalino, principalmente a través de residuos amf

genos  $\beta$  de lisina y grupos amígenos terminales; presenta una absorción máxima a 490-495 nanómetros (nm) y emite su color verde característico a 517 nm. El isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC) también se conjuga fácilmente con las proteínas, emite luz roja presentando su absorción máxima a 550 nm y una emisión máxima a 580 nm.

A continuación se mencionan, en términos generales, las ventajas y desventajas de este método.

**Ventajas:**

1. Sensibilidad mediana (miligramos/mililitro)
2. Especificidad satisfactoria
3. Ausencia de riesgo a la radiación

**Desventajas:**

1. Reactivos con corto tiempo de vida media
2. Equipo costoso y especializado
3. Experiencia para la interpretación de la prueba

Existen dos variantes metodológicas de la técnica de inmuno fluorescencia:



#### INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

También se conoce como inmunofluorescencia en un solo paso, se utiliza para la identificación de VIH en biopsias de tejidos de los pacientes sospechosos de padecer SIDA. El anticuerpo conjugado se añade directamente al corte de tejido o suspensión de células viables, fijándose los anticuerpos específicos a los antígenos formando un complejo fluorescente estable. Las proteínas que no reaccionan se eliminan mediante lavados y la preparación resultante se observa en un microscopio fluorescente (30).

#### INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Se utiliza tanto para la detección del virus como de sus anticuerpos específicos en muestras de suero o plasma de los pacientes. En esencia, el método es una adaptación de la reacción antiglobulínica (prueba de Coombs) o técnica del doble anticuerpo, eliminando la necesidad de purificar cada muestra de suero pero requiriendo la preparación de una antiglobulina conjugada. Las muestras de suero se hacen reaccionar con el antígeno deseado, posteriormente se adiciona el anti-anticuerpo conjugado; las proteínas plasmáticas que no reaccionan se eliminan de la preparación, por último se observa al microscopio de fluorescencia (31), (32).

#### 4.3. RADIOINMUNOANALISIS (RIA)

Es una técnica basada en la alta especificidad de los anticuerpos y en la sensibilidad de los detectores a pequeñas cantidades de radioactividad. Algunos autores han reportado el uso del RIA para la búsqueda de anticuerpos contra VIH (29), (33). En este procedimiento el antígeno específico se une covalentemente a partículas activadas como perlas de celulosa o discos de papel, se adiciona el suero sospechoso de contener anticuerpos y se procede a un período de incubación. Se lava y se adiciona el anti-anticuerpo mono-específico marcado radiactivamente. Después de una segunda incubación se lava y se mide la radiactividad residual, y la cantidad de anti-anticuerpo radiactivo unido se relaciona directamente con la cantidad de anticuerpo específico presente en la muestra de prueba. Los radioisótopos más utilizados son el  $I^{125}$  y el  $I^{131}$ .

A continuación se mencionan, en términos generales, las ventajas y desventajas del RIA.

Ventajas:

1. Sensibilidad elevada (picogramos/mililitro)
2. Especificidad satisfactoria
3. Potencial para su automatización y computación

#### Desventajas:

1. Riesgos potenciales a la radiación
2. Problemas para la eliminación de los desechos radiactivos
3. Relativa inestabilidad de los compuestos marcados radiac\_tivamente (vida media corta)
4. Costo elevado del equipo

#### 4.4. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (METODO WESTERN BLOT)

Es una técnica utilizada para la búsqueda de anticuerpos contra VIH; se considera el método más sensible para la detec\_ción de anticuerpos contra proteínas virales individuales (34). Se fundamenta en que las proteínas antigénicas se unen firmemen\_te, aunque no covalentemente, a una matriz de nitrocelulosa por lo que es posible transferir un antígeno, mezcla de antígenos o un digerido parcial del antígeno de un gel (generalmente poliacri\_lamida) hacia una tira de nitrocelulosa. Esta técnica fué origi\_nalmente desarrollada por Towbin y col., en 1979 (35).

A continuación se describe, de manera generalizada, la metodolo\_gía del método Western blot:

1. Solubilizar el antígeno en cuestión en el gel de poliacri\_lamida; si se usa un agente desnaturizante en el gel, como el dodecil sulfato de sodio, el antígeno se debe so\_lubilizar primero en éste

2. Realizar la transferencia del antígeno desde el gel hacia el papel de nitrocelulosa por medio de electroforesis
3. Teñir el papel con un colorante como el negro amido 0.1%
4. Incubar el papel con el suero problema, lavar
5. Incubar con un segundo anticuerpo (monoclonal) conjugado con una enzima, lavar
6. Incubar con el sustrato de la enzima, lavar
7. Se debe observar la aparición de bandas coloridas sobre las tiras de nitrocelulosa correspondientes al antígeno.

Existen variaciones a la inmunoelectrotransferencia, las principales se relacionan al tipo de papel y a las técnicas para la detección de actividad anticuerpo:

1. El uso del papel aminobenciloximetil diazotizado presenta la ventaja sobre la nitrocelulosa de que las proteínas se unen covalentemente a él, pero su extrema fragilidad limita su utilización repetida
2. En la detección de actividad anticuerpo por técnicas inmunoenzimáticas la peroxidasa es comunmente la enzima elegida, existiendo varios posibles sustratos comercialmente disponibles
3. Se pueden utilizar segundos anticuerpos marcados radiactivamente para la detección de actividad anticuerpo

4. La aplicación del Western blot a digeridos parciales de antígenos es útil para la localización de epitopes, con lo que es posible encontrar diferencias entre antígenos que varían en solo una determinante antigénica

En términos generales, a continuación se mencionan las ventajas y desventajas de la inmunolectrotransferencia.

**Ventajas:**

1. Sensibilidad elevada
2. Especificidad elevada
3. Detecta diferencias a nivel de determinantes antigénicas

**Desventajas:**

1. Tecnología difícil
2. Requiere el uso de variados controles para la correcta interpretación de los resultados

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. MATERIAL Y METODO

#### 5.1.1. EQUIPO

Para llevar a cabo la determinación de anticuerpos contra el VIH en muestras de suero de los individuos incluidos en la presente investigación se empleó un juego de reactivos o "Kit Abbott HTLV III EIA", con registro No 1388 R 85 SSA, lote No. 81/24 HR, el cual consta de los siguientes componentes:

1. Cien esferas de polietileno recubiertas con antígeno VIH (inactivado)
2. Un frasco con 20 ml de anti-IgG humana conjugada con peroxidasa. Concentración mínima de 0.01 microgramos/ml en un sistema amortiguador de HEPES y con azida de sodio al 0.1% como conservador
3. Un frasco con 0.45 ml de control positivo, a base de plasma humano positivo para anticuerpos contra VIH (inactivado). Título mínimo de 1:2 con azida de sodio al 0.1% como conservador
4. Un frasco con 0.3 ml de control negativo, a base de plas\_

ma humano negativo para anticuerpos contra VIH con azida de sodio al 0.1% como conservador

5. Dos frascos con 20 ml cada uno de diluyente para muestras, conteniendo suero bovino y de cabra con azida de sodio al 0.1% como conservador
6. Un frasco con 10 tabletas de orto-fenilendiamina (tabletas con 12.8 miligramos)
7. Un frasco con 55 ml de diluyente para tabletas de orto-fenilendiamina, a base de amortiguador de citratos-fosfatos y peróxido de hidrógeno al 0.2%
8. Placas de reacción con 25 cavidades de fondo redondo, cada una
9. Folios adhesivos (parafilm)
10. Cien tubos de ensaye de polietileno

Además de este juego de reactivos donado por Abbott Laboratories de México, S.A., se empleó el siguiente equipo de laboratorio:

1. Un baño maria modelo J.M. Ortiz, calibrado a 40°C (110 V, 25 A, 50-60 ciclos, registro S.I.C. D.G.E. 774)
2. Un espectrofotómetro de alta precisión, programable semi-automático modelo Quantum II, marca Abbott. También conocido como Analizador clínico de onda dual para determinaciones inmunoenzimáticas

### 3. Un sistema pentawash tipo II, marca Abbott

Durante la realización del ensayo para la determinación de anticuerpos contra VIH por el método inmunoenzimático ELISA, se requiere del uso de un sistema que permita el correcto lavado de las esferas después de la adición de cada reactivo y de las incubaciones necesarias, para que éste sea adecuado y no conduzca a falsos resultados. En la presente investigación el sistema utilizado fué el pentawash tipo II (ver figura 3).

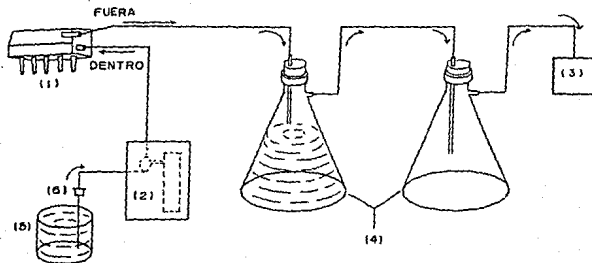
#### 5.1.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Los individuos incluidos en la presente investigación cumplen al menos con una de las siguientes características:

1. Infecciones de vías respiratorias, específicamente alguna de las dos clases mencionadas a continuación:
  - A. Tuberculosis pulmonar; los pacientes de este grupo se encontraban entre los 20 y 60 años
  - B. Neumonías; los pacientes de este grupo se encontraban entre los 50 y 65 años
2. Cánceres de vías respiratorias; los pacientes de este grupo se encontraban entre los 45 y 65 años
3. Antecedentes de comportamiento homosexual y sexo masculino; individuos con edades entre 20 y 40 años



FIGURA 3. Esquema del sistema utilizado para el lavado de las esferas.



- (1). Sondas del pentawash
- (2). Distribuidor semi-automático, capacidad mínima 25 ml/ciclo
- (3). Bomba de vacío
- (4). Trampa de vacío, a base de frascos para filtración de pared gruesa
- (5). Trampa para el líquido de lavado
- (6). Filtro

### 5.1.3. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

En todos los casos las muestras analizadas, que consistieron de sueros de los individuos incluidos en el estudio, fueron sometidas a un pre-tratamiento de dilución antes de aplicarles el método para la detección de anticuerpos contra VIH, de la manera siguiente: distribuir 10 microlitros (mcl) de cada muestra a analizar en el fondo de tubos de ensaye apropiados, adicionar 200 mcl de diluyente para muestras a cada tubo, mezclar meticulosamente. Los controles positivo y negativo no requieren de este tratamiento de dilución.

Las muestras diluidas y los controles positivo y negativo se sometieron al siguiente procedimiento de ensayo (ver figura 4):

#### PRIMERA INCUBACION

1. Distribuir 10 mcl de cada control y muestra diluida en el fondo de las cavidades apropiadas de la placa de reacción. En cada corrida de muestras, independientemente del número de las mismas, se corren tres controles positivos y dos negativos
2. Distribuir 200 mcl de diluyente para muestras a cada cavidad que contenga un control o una muestra diluida
3. Agregar cuidadosamente una esfera a cada cavidad que contenga un control o una muestra diluida

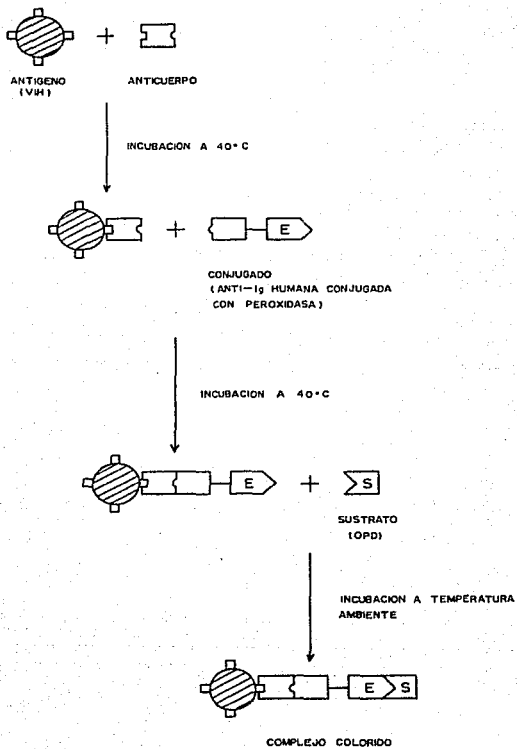


FIGURA 4 . DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE ENSAYO .

4. Cubrir con un folio adhesivo cada cavidad, golpear suavemente la placa para que el líquido cubra las esferas y para eliminar las burbujas de aire que hayan quedado atrapadas
5. Incubar a 40°C durante una hora  $\pm$  5 minutos
6. Retirar el folio adhesivo, con la ayuda del sistema pentawash aspirar el líquido y lavar cada esfera tres veces con 4-6 ml de agua destilada o desionizada

#### SEGUNDA INCUBACION

7. Pipetear 200 mcl del conjugado en cada cavidad que contenga una esfera
8. Cubrir con folio adhesivo, golpear suavemente la placa para que el líquido cubra las esferas y eliminar las burbujas de aire que hayan quedado atrapadas.
9. Incubar a 40°C durante dos horas  $\pm$  10 minutos
10. Retirar el folio adhesivo, con ayuda del sistema pentawash aspirar el líquido y lavar cada esfera tres veces con 4-6 ml de agua destilada o desionizada

#### DESARROLLO DEL COLOR

11. Transferir inmediatamente las esferas a tubos de ensaye debidamente identificados
12. Pipetear 300 mcl de la solución sustrato de orto-fenilendiamina-2HCl (OPD), recién preparada, a dos tubos de ensa

- ye vacíos (blancos de sustrato) y a cada tubo que contiene una esfera. La solución de sustrato OPD se debe preparar de 5-10 minutos antes del desarrollo de color de la manera siguiente: adicionar 5 ml de diluyente para OPD a un recipiente adecuado agregar una tableta de OPD, dejar disolver la tableta, agitar suavemente para obtener una solución homogénea; no usar ninguna tableta que no este intacta. La solución no se debe guardar por más de 60 min.
13. Cubrir con un folio adhesivo cada tubo, incubar a temperatura ambiente durante  $30 \pm 2$  minutos
  14. Adicionar un ml de ácido sulfúrico 1.0 N a cada tubo

#### **LECTURA**

15. Ajustar a "cero" el espectrofotómetro con un blanco de sustrato a 492 nm
  16. Determinar la absorción de los controles y de las muestras a analizar a 492 nm
- En el presente trabajo, en los casos que fué necesario, se utilizó agua desionizada.

Todos los materiales biológicos del juego de reactivos se manejan como si fueran capaces de transmitir la infección con VIH, por lo que el material de laboratorio utilizado (placas y tubos de reacción de polietileno, material de vidrio, puntas de micropi

petas), los desechos líquidos y todas las áreas de trabajo que estuvieron en contacto con el material biológico por analizar o con los reactivos utilizados se descontaminaron después de su uso con solución al 1.0% de hipoclorito de sodio durante 24 horas. Los desechos líquidos ácidos neutralizados con una cantidad apropiada de base y los desechos líquidos que no contenían ácido se mezclaron con hipoclorito de sodio en volúmenes tales que la mezcla final tenía una concentración de hipoclorito de sodio al 1.0%, se dejaron en contacto con el desinfectante por 24 horas.

El material desinfectado se lavó de la manera acostumbrada con detergente y agua, recuperándose sólo el material de vidrio y eliminando lo demás. Durante la manipulación de los reactivos y de las muestras se utilizaron guantes desechables, los que después de su uso se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121°C y desechándose después.

Por último, se siguieron todos los cuidados necesarios de trabajo para un laboratorio clínico.

#### **ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS Y MUESTRAS**

Las condiciones de almacenamiento de los reactivos utilizados fueron las siguientes:

1. Temperatura de almacenamiento entre 2 y 8°C

2. Mantener durante todo el tiempo de almacenamiento los sa  
cos desecantes dentro del frasco de tabletas OPD, los cu  
les son suministrados por el fabricante

Antes de utilizar los reactivos, éstos deben alcanzar la tempera\_  
tura ambiente (aproximadamente 30 minutos); inmediatamente después  
de su uso se almacenan bajo las condiciones antes mencionadas. La  
solución de OPD reconstituida debe mantenerse a temperatura am\_  
biente, se debe usar dentro de los 60 minutos después y no se de\_  
be exponer a la luz (preparar y guardar en frascos ámbar).

## 5.2. CALCULOS

A continuación se menciona la forma de realizar los cálculos  
que deben hacerse para dar los resultados del ensayo, según la ca\_  
sa fabricante:

1. CALCULO DE LA ABSORCION PROMEDIO DE LOS CONTROLES NEGATI -  
VOS ( $\bar{x}$  CN)

Se determina sumando los valores individuales de los con\_  
troles negativos y dividiendo la sumatoria entre el núme\_  
ro de controles negativos. Los valores individuales debe\_  
rán ser iguales o inferiores a 0.100 o mayores o iguales  
a 0.010 y deben caer dentro del intervalo 0.5 - 1.5 veces  
el promedio de los controles negativos. Si un valor se en

cuentra fuera de este margen, la prueba se debe repetir; si más de un valor está fuera, debe haber problemas de tipo técnico que se deben corregir

## 2. CALCULO DE LA ABSORCION PROMEDIO DE LOS CONTROLES POSITIVOS ( $\bar{x}$ CP)

Se determina sumando los valores individuales de los controles positivos y dividiendo la sumatoria entre el número de controles positivos. Los valores individuales deben ser iguales o inferiores a 2.000 o mayores o iguales a 0.400, y deben caer dentro del intervalo 0.5 - 1.5 veces el promedio de los controles positivos. Si un valor se encuentra fuera de este margen, se descarta el valor y se vuelve a calcular el promedio con los dos valores restantes; si dos valores están fuera de este margen, la prueba debe repetirse

## 3. CALCULO DEL VALOR LIMITE (VL)

El valor límite se determina aplicando la siguiente fórmula:

$$VL = \bar{x} CN + [(0.1)(\bar{x} CP)]$$

## 4. CALCULO DE LA DIFERENCIA P - N

Se refiere a la diferencia entre el  $\bar{x}$  CP y el  $\bar{x}$  CN. Para que el ensayo sea válido el valor P - N debe ser igual o superior a 0.400; de no ocurrir así se sospecha de una falla



lla técnica o de descomposición de los reactivos y la prueba debe repetirse

### 5.3. CRITERIOS

Los criterios seguidos en la presente investigación fueron los establecidos por el proveedor, y se mencionan a continuación:

1. Las muestras con valores de absorción inferiores al valor límite se consideran negativas para anticuerpos contra VIH
2. Las muestras con valores de absorción superiores al valor límite se consideran reactivas y deben repetirse usando una nueva muestra del paciente antes de la interpretación
3. Las muestras que se hayan encontrado repetidamente reactivas se consideran positivas para anticuerpos contra VIH
4. Las muestras inicialmente reactivas que resulten negativas después de la repetición del análisis, se deben volver a analizar utilizando una nueva muestra de suero del paciente

## 6. RESULTADOS

TABLA 1. SEROPOSITIVIDAD EN LOS INDIVIDUOS CON ANTECEDENTES DE HOMOSEXUALIDAD DE ACAPULCO, GUERRERO.

	NUMERO DE MUESTRAS
Diagnóstico	---
Positivo	1
Negativo	13
TOTAL	14

Relación de muestras de suero analizadas en individuos de sexo masculino con antecedentes de homosexualidad y ningún diagnóstico previo.

TABLA 2. SEROPOSITIVIDAD EN LOS 58 PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.

NUMERO DE MUESTRAS	DIAGNOSTICO	POSITIVO	NEGATIVO
3	Probable SIDA	1	2
7	Neumonía	-	7
15	Cáncer de vías respiratorias	-	15
33	Tuberculosis pulmonar	-	33
TOTAL 58		1	57

Relación de muestras de suero analizadas en pacientes con algún diagnóstico previo, mediante la utilización del "Kit Abbott HTLV III EIA".

TABLA 3. REPETIBILIDAD EN EL ENSAYO PARA LA DETECCION DE ANTI -  
 CUERPOS CONTRA VIH.

NUMERO DE MUESTRA	SEXO	EDAD (AÑOS)	ANTICUERPOS CONTRA VIH		
1	Femenino	35	Positivo <sup>+</sup>	Negativo	Negativo
2	Masculino	47	Positivo	Positivo	Positivo
3	Masculino	25	Positivo	Positivo	Positivo
4	Masculino	54	Negativo	Negativo	Negativo

En donde, la muestra número (1) corresponde a una mujer con diagnóstico previo de probable SIDA, la muestra fue proporcionada por Abbott de México ( + este resultado no fue obtenido en nuestra investigación, fue proporcionada por Abbott de México); la (2) a un paciente del INER con diagnóstico previo de neumonía y probable SIDA; la (3) a un individuo de sexo masculino con antecedentes de homosexualidad de Acapulco, Guerrero y sin ningún diagnóstico previo; y la (4) a un paciente del INER de sexo masculino con diagnóstico previo de neumonía.

La repetibilidad para la detección de anticuerpos contra VIH se realizó de la siguiente manera: en las muestras (1) y (3) el ensayo se repitió dos y tres veces respectivamente a partir de la muestra original, puesto que no fué posible adquirir nuevas muestras; y en las muestras (2) y (4) el ensayo se repitió tres veces en cada caso, a partir de muestras recientemente tomadas de cada uno de los pacientes en tres días diferentes.

En todas las tablas anteriores, el término positivo se refiere a la detección de anticuerpos contra VIH por el método inmunoenzimático ELISA, mediante la utilización del "Kit Abbott HTLV III EIA"; y el término negativo se refiere a la ausencia de los mismos.

## 7. DISCUSION Y COMENTARIOS

Del total de muestras analizadas (72), se detectaron dos que mostraron una repetida reactividad para anticuerpos contra VIH: una correspondiente a un individuo de sexo masculino sano (sin diagnóstico previo) con antecedentes de homosexualidad de Acapulco, Guerrero; y la otra a un paciente de sexo masculino del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con diagnóstico previo de neumonía y probable SIDA. Por desgracia, debido a razones ajenas, no fué posible conseguir la información necesaria para verificar si el homosexual que presentó evidencia de anticuerpos contra VIH posteriormente desarrolló o no la enfermedad; con respecto al paciente del INER en el que también se detectaron anticuerpos contra VIH se sabe que posteriormente al estudio murió de SIDA, pero no fué posible incluir, en el presente trabajo, la historia clínica ni las pruebas de laboratorio que lo demuestran, si bien el diagnóstico clínico fué confirmado por autopsia, entre otras pruebas.

En la presente investigación, no se realizó un estudio estadístico puesto que se consideró que las muestras incluidas en ca\_

da uno de los grupos del estudio no son suficientes para esto; por otra parte, no fue posible ampliar el número de muestras por limitación de los reactivos, los cuales debido a su costo y a la política del INER se consideraron poco costeables, incluso en el presente la prueba no se realiza en este Instituto.

Las experiencias personales obtenidas al realizar este trabajo permiten concluir que la técnica inmunoenzimática ELISA es un método útil para la determinación de anticuerpos contra VIH, ya que presenta características tales como:

1. Sencillez
2. Especificidad satisfactoria
3. Sensibilidad satisfactoria

Además su realización se facilita por la existencia de juegos completos de reactivos, como el utilizado aquí, disponibles comercialmente.

Lo anterior está apoyado por el hecho de que éste es el método elegido para la detección de anticuerpos contra VIH en muestras de suero y plasma de posibles donadores de sangre o de pacientes con diagnóstico de probable SIDA en Institutos tales como el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea y el Instituto Nacional de la Nutrición, ambos de la Secretaría de Salud.

Las limitaciones para este método, que podrían hacerlo in\_  
costeable en algunos hospitales o laboratorios, se refieren prin\_  
cipalmente a:

1. Relativo alto costo del juego de reactivos
2. Necesidad de contar con equipo especial como un espectro\_  
fotómetro adecuado y el sistema para el lavado de las es\_  
feras

LA BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD  
DE  
MEXICO



## BIBLIOGRAFIA

1. Quinn, T.C.: Precautions for patients hospitalized with Acquired Immunodeficiency Syndrome. Infect. Control 4/2 : 79 (1983)
2. Reportado por el Consejo en Asuntos Científicos: El síndrome de inmunodeficiencia adquirida. JAMA 252 : 2037 (1984)
3. Montagnier, L.; Gallo, R.C.: U.S., French studies link leukemia virus to AIDS. Hospital Practice 33 : 37 (1983)
4. Reported by The Centers for Disease Control, The Food and Drug Administration, and The National Institutes of Health: Prevention of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS): report of inter-agency recommendations. JAMA 249/2 : 1544 (1983)
5. Mildvan, D.; Mathur, U.; Enlow, R.W.; Israel, E.; Armstrong, D.; Gold, J.; Sears, C.; Wong, E.; Henry, S.; Safai, E.; Kettering, S.; Brown, E.; Arlin, Z.; Metrokac, C.; Drusin, L.; Spigland, I.; Williams, C.; Lukes-Roosevelt; Siegal, F.; Brown, J.; Wallance, J.; Sencer, D.: Persistent, Generalized Lymphadenopathy among homosexual males. JMWR 31/21 : 249 (1982)
6. Offestandt, G.; Pinta, P.: Multiple opportunistic infection due to AIDS in a previously healthy black woman from Zaire. Correspondence 308 / 13 : 775 (1983)
7. Benítez, B.L.: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA):

una nueva entidad nosológica. Rev. Med. IMSS 21 : 527 (1983)

8. Abud-Mendoza, C.; Alcocer-Varela, J.; González-Amaro, R.; Díaz-Jouanen, E.; Alarcón-Segovia, D.: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Rev. Invest. Clin. 36 : 311 (1984)
9. Stanislawski, E.C.; Ibarra, P.C.; Elizalde, G.J., Narváes, P.O.; Carrillo, S.: Un caso de síndrome de inmunodeficiencia adquirida de un sujeto homosexual masculino en México. I: aspectos microscópicos y ultraestructurales. Rev. Med. IMSS 22 : 121 (1984)
10. Malcolm, S.; Rimland, D.: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Mundo Médico 11 : 11 (Noviembre 1984)
11. Revista de Información Científica y Tecnológica. México, D.F. 11/148 : 31 (1989)
12. Segatore, L.; Poli, G. Diccionario Médico Teide. Barcelona, España 1978. Ed. Teide, p: 1100
13. Revista de Información Científica y Tecnológica. México, D.F. 9/132 : 5 (1987)
14. Marx, J.L.: Strong new candidate for AIDS agent. Science 224 : 475 (1984)
15. Handzel, S.: Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)-Canada. MMWR 32/48 : 635 (1983)

16. Martínez-Cairo, C.S.: Diagnóstico de inmunodeficiencia en el paciente con infección crónica recurrente. Rev. Med. IMSS 19/2 : 240 (1981)
17. Rubinstein, A.; Sicklick, M.; Gupta, A.; Bernstein, L.; Klein, N.; Rubinstein, E.; Spigland, L.L.; Fruchter, L.; Litman, N.; Iee, H.; Hollander, M.: Acquired Immunodeficiency with reversed T4/T8 ratios in infants born to promiscuous and drug-addicted mothers. JAMA 249/17 : 2350 (1983)
18. Gallo, R.C.; Sarin, P.S.: Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Science 220 : 855 (1983)
19. Koch, M.: Science of AIDS, the anatomy of virus. New Scientist 1553 : 45 (1987)
20. Scott, A.: Science of AIDS, the virus behind the disease. New Scientist 1553 : 38 (1987)
21. Gallo, R.C.: The AIDS virus, II. Scientific American. 257/5 : 39 (1988)
22. Boletín del Comité Nacional de Prevención del SIDA. México, D.F. 1/7 : 122 (1987)
23. Baum, R.M.: AIDS researchers make inroads in understanding a complex virus. C & EN 12 : 7 (1986)

24. Popovic, M.; Sarngadharan, M.G.; Read, E.; Gallo, R.C.: Detec-  
tion, Isolation, and continuous production of Cytopathic Re-  
troviruses (HTLV III) from patients with AIDS and pre-AIDS.  
Science 224 : 497 (1984)
25. Vieira, J.; Frank, E.; Spira, T.J.; Landesman, S.H.: Acquired  
Immune Deficiency in Haitians. N. Engl. J. Med. 308/3 : 125  
(1983)
26. Barre-Sinoussi, F.; Cherman, J.C.; Rety, F.; Nugeyre, T.M.; Cha-  
maret, S.; Gruest, J.; Dauquet, C.; Axler-Elin, C.; Vezinet-Brun,  
F.; Rouzioun, C.; Rozebaum, W.; Montagnier, L.: Isolation of a  
T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired  
immunodeficiency syndrome (AIDS). Science 220 : 868 (1983)
27. Fudenberg, H.H.; Stites, D.P.; Caldwell, L.J. Inmunología clíni-  
ca. México, D.F. 1984 Ed. El manual moderno, p: 379-392
28. Barret, T.J. Textbook of Immunology. An Introduction to Immuno-  
chemistry and Immunobiology. 3th edition. USA 1978. Ed. The  
C. V. Mosby Company, Saint Louis, p: 159-170
29. Baruj Benacerrrat; Unanue, R.E. Textbook of immunology. USA  
1979. Ed. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, p: 66 -  
68, 72-74
30. Gelman, E.P.; Blayney, D.: Proviral DNA of a Retrovirus, Human  
T-cell Leukemia Virus, in two patients with AIDS. Science

220 : 862 (1983)

31. Essex, M.; Mc Lane, F.M.; Falk, L.; Howe, S.W.C.; Lee, T.H.; Mullins, I.J.: Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS. Science 220 : 859 (1983)
32. Popose, J.S.; Nestor, M.S.; Holland, G.N.; Cochran, A.J.; Foos, R.Y.: An analysis of retinal cotton-wool spots and cytomegalovirus retinitis in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. Am. J. Ophthalmol. 95/1 : 118 (1983)
33. Amman, J.A.; Schiffman, G.: B-cell immunodeficiency in Acquired Immune Deficiency Syndrome. JAMA 251/11 : 1447 (1984)
34. Safai, B.; Sarngharan, N.G.; Groopman, J.E.; Arnett, K.; Popovic, M.; Sliski, A.; Schüpbach, J.; Gallo, R.C.: Seroepidemiological studies of human T-lymphotropic retrovirus type III in Acquired Immunodeficiency Syndrome. Lancet 8392 : 1438 (1984)
35. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350 (1979)