

23
24



Universidad Nacional Autónoma
de México.

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

EVALUACION DE LA TECNICA DE ELISA (Enzyme-
Linked Absorbent Assay) PARA LA DETECCION DE
ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ANGELICA MARIA MADRID VELAZQUEZ

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

C O N T E N I D O

INTRODUCCION	Página
Capítulo	
I. GENERALIDADES	
1.1 Etiología	1
1.2 Infección	8
1.3 Grupos de riesgo	15
1.4 Epidemiología	17
1.5 Diagnóstico serológico del VIH	19
2. FUNDAMENTACION DEL TEMA	
2.1 Planteamiento del problema.....	22
2.2 Justificación del problema	23
2.3 Objetivos	24
2.4 Hipótesis	25
3. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Material	26
3.2 Equipo	26
3.3 Material biológico	27
3.4 Reactivos	28
3.5 Métodos 3.5.1 ELISA	29
3.5.1 WESTERN BLOT	33
4. RESULTADOS	
4.1 Resultados	38
4.2 Análisis de resultados	44
5. CONCLUSIONES	46
6. BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUCCION

En Junio de 1981 se notificaron en la ciudad de los Angeles California cinco casos de Neumonía por *Pneumocystis carinii* en hombres homosexuales. Este hecho llamo la atención por su coincidencia temporal y por ser el agente causal inocuo en personas inmunocompetentes. Los pacientes - habían tenido fiebre y fatiga varios meses antes de la Neumonía. Al momento de su hospitalización tenían además Candidiasis y otras enfermedades oportunistas. Todos se encontraban anérgicos y linfopénicos con inmnodeficiencia celular severa.

Un mes más tarde aparecieron casos de Sarcoma de Kaposi y más de Neumonia en jóvenes homosexuales de los Estados de Nueva York y California. A partir de entonces el Centro para el Control de Enfermedades (CDC), de los Estados Unidos organizó un equipo de trabajo encargado exclusivamente de investigación y vigilancia epidemiológica de este nuevo brote de - infecciones oportunistas y Sarcoma de Kaposi.

Para Septiembre de 1982 el CDC había detectado 593 casos de lo que para entonces se decidió llamar Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, SIDA. En Mayo de 1983, Luc Montgnier y colaboradores del Instituto Pasteur de Francia y un año más tarde Robert C.Gallo y colaboradores del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, aislaron e identificaron al agente causal del SIDA, un virus que pertenece a la familia de los retro virus.

El grupo francés le llamo virus asociado a linfocadenopatía (LAV), y los norteamericanos virus T-linfotrópico humano III (HTLV III).

En Mayo de 1986, el Comite Taxonómico de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), propuso denominar al virus del SIDA, Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el virus tiene un tropismo específico hacia el subconjunto de los linfocitos T-4 de las células cooperadoras T, con destrucción celular y afectando por tanto al sistema inmunológico, por lo que esta enfermedad tiene un alto índice de mortalidad.

El VIH se transmite por tres vías: sexual, transfusional y transplacentaria debido a que el periodo de incubación es largo, existe un gran número de - personas infectadas asintomáticas pero infectantes; así como también personas sintomáticas, por lo que esta enfermedad constituye un grave problema de salud pública en México y en todo el Mundo.

Debido a lo anterior es necesario detectar la presencia de este virus en la población por lo que se decidió evaluar la técnica Inmunoenzimática ELISA, para la determinación de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

I. GENERALIDADES

1.1 ETIOLOGIA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia Retroviridae. Esta familia se divide en tres subfamilias:

Oncoviridae
Retroviridae Lentoviridae
 Spumaviridae

Los oncovirus, retrovirus oncogénicos o productores de cáncer incluyen a HTLV I y al HTLV II.

Los lentovirus que incluyen al VIH son responsables de padecimientos neurológicos, musculoesquelético, hematológico y respiratorios en mamíferos que se manifiestan después de largos períodos de incubación.

Los espumavirus incluyen algunos virus de bovinos, felinos, simios y humanos que persisten en su huésped sin producir patología.(1)

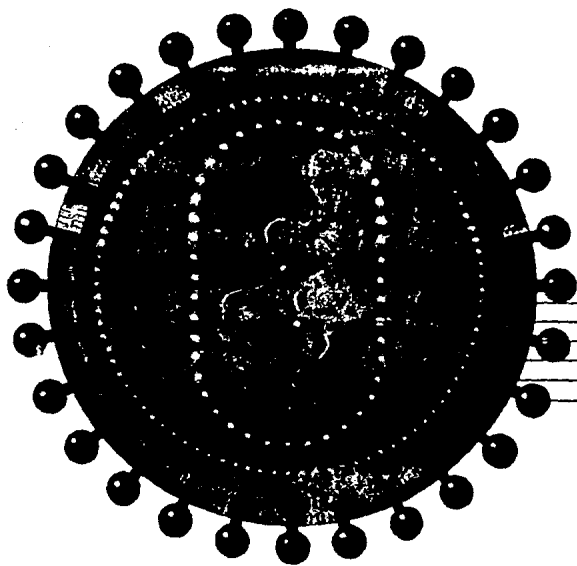
Los retrovirus almacenan su información genética en forma de ácido ribonucleico, RNA. La capacidad de los retrovirus para formar ácido desoxirribonucleico, DNA a partir de RNA se debe a la presencia de una enzima llamada Transcriptasa reversa, una vez formado el DNA puede introducirse entonces en el DNA de la célula huésped de su maquinaria genética y replicarse.

La estructura del VIH se caracteriza por tener una nucleocápside de 20 caras icosaédricas; dentro de él se halla una estructura cilíndrica formada por proteínas que contienen y protegen en su interior al RNA asociado con la Transcriptasa reversa. El tamaño del VIH es de aproximadamente de 0.1 micras (2) (figura 1).

La membrana que envuelve al material genético RNA está compuesta por dos capas proteicas y otra grasa en la que hay proteínas con azúcares (glicoproteínas). Estas glicoproteínas como todos los retrovirus sobresalen de la membrana y están compuestas por dos glicoproteínas una encima de la otra.

En el VIH la glicoproteína sobrepuesta es la gp 120 kd. y la sesil la gp 41-kd, la parte interior de la gp 41 es larga y contiene más de un centenar de aminoácidos. Junto al material genético se encuentra la enzima Transcriptasa reversa.(3)

Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)



Estructura Física

RNA

Transcriptasa Inversa

p24

p18

gp41

gp120

RETROVIRUS HUMANOS.

Los retrovirus fueron identificados como agentes infecciosos a principios del siglo veinte. Inicialmente fueron descritos como agentes etiológicos de algunas leucemias y sarcomas en pollos.

Desde entonces se han identificado como la causa de muchos otros padecimientos en una amplia variedad de animales.

Primeramente se logró aislar el retrovirus responsable de una enfermedad humana: un tipo de leucemia poco frecuente de células-T. Este retrovirus humano fue denominado virus linfotrópico de células -T humanas tipo I - HTLV I y es el agente causal de la leucemia de células-T en adultos.

Anteriormente se aisló un virus distinto, aunque relacionado con HTLV I de una persona con un tipo de leucemia (leucemia de células "peludas" o - reticuloendoteliosis) denominándosele HTLV II.

El VIH fué el tercer tipo de retrovirus aislado (llamándosele inicialmente HTLV III ó LAV) de pacientes con SIDA.

En 1986 KANKI y colaboradores aislaron en Africa Occidental otro retrovirus el VIH 2 (HTLV IV) (cuadro 1).

Existen diversos análisis comparativos entre los retrovirus humanos conocidos hasta el momento, características comunes a todos:

- 1) Mecanismos de transmisión
- 2) Afinidad por los linfocitos T-4
- 3) Capacidad de alterar células T-4 in vitro
- 4) Presencia de un gen "tat" adicional a los tres comunes a todos los retrovirus "gag" "pol" y "env".

El VIH 2 muestra la misma morfología, linfotropismo y efecto citopático que el VIH I, sin embargo se han encontrado diferencias en el genoma en pruebas de hibridación entre los dos virus.

Al parecer el VIH I es más virulento in vitro que el VIH 2.

El Dr. Robert C. Gallo propone una clasificación de los retrovirus humanos y la enfermedad que causan cada uno de ellos. (4).

CUADRO No. 1

VIRUS	ENFERMEDAD
HTLV I	Leucemia aguda de células T (ALT) Linfoma de células B Inmunodeficiencia menor HTLV I asociado a Mielopatía
HTLV II	Leucemias de células de Hairy (Leucemias de células peludas o reticuloendoteliosis leucémica) Linfoma crónico de células T-4
HTLV III ó VIH-1	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
HTLV IV ó VIH-2	Algunas inmunodeficiencias
HTLV V	Micosis Linfoma de células T cutáneas.

ESTRUCTURA GENETICA DEL VIH.

Los retrovirus una vez que convierten su información genética RNA a DNA se integran al genoma de la célula a la que infectan denominándose entonces provirus.

El provirus del VIH integrado a los cromosomas de la célula infectada poseen tres grupos de genes: estructurales, reguladores y de acción desconocida.

Los genes estructurales son "gag", "pol" y "env".

Los genes reguladores son "LTR", "tat" y "art".

Los genes con función desconocida son "sor" y "3' orf".

Figura 2 y cuadro 2.

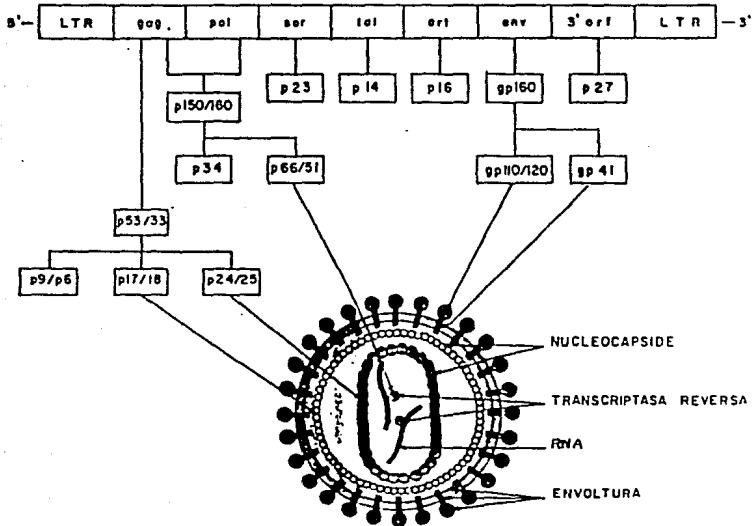
El gen "pol" codifica la transcriptasa reversa junto con el "gag", juntos codifican primero un precursor de 160 kd. que debe ser procesado para dar la enzima activa p66/51. La polimerasa codificada por este gen tiene tres dominios conservados en todas las secuencias, ya que sus funciones son cruciales para la replicación viral.

El "env" codifica la síntesis de las glicoproteínas de la membrana de la envoltura y la gp110/120, que se localiza en el exterior de la misma.

La gp110/120 es la glicoproteína responsable que el VIH reconozca y se adhiera exclusivamente a células portadoras del marcador biológico CD4, presentes en los linfocitos T-cooperadores/efectores.

Los genes reguladores controlan la actividad genética viral al indicar el sitio de inicio y de terminación de la lectura, función del "LTR", y son los encargados de activar, desactivar y determinar la cantidad de proteínas virales que van a sintetizar, funciones del "tat" y del "art".(5).

FIGURA 2



REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL VIH Y DE SU ESTRUCTURA GENETICA.

CUADRO No. 2

ESTRUCTURA GENETICA DEL VIH

GENES	SIGNIFICADO	MARCADORES
L T R	Secuencia Repetida de Terminación Larga	
gag	Antígenos de Nucleocápside Grupos Específicos	p53/55 p9-p6 p17/18 p24/25
pol	Transcriptasa reversa	p160 p34 p66/51
sor	Secuencia Corta de Inicio de Lectura	p23
env	Envoltura	gp160 gp41 gp110/120
tat	Transactivador	p14
art	Transactivador Anti-represivo	p16
3'orf	Secuencia de Inicio de la Lectura 3'	p27

1.2 INFECCION

Interacción célula-virus en infección por VIH.

El VIH sólo afecta células que poseen en la superficie de la membrana un receptor conocido como CD4. Las células que poseen este receptor son los linfocitos-T cooperadores T4 de la inmunidad, que corresponden a glóbulos blancos con una función primordial en la regulación de la respuesta inmune y a las células accesorias de la inmunidad que corresponden a monocitos/macrófagos, células dentríticas, células de Langerhans y células de la G1fa, todas responsables de llevar a cabo la captura de microorganismos, procesarlos y presentarlos de manera apropiada a las células responsables de llevar a cabo la respuesta inmune.

Mecanismo de ataque celular.

Como el VIH ataca solamente a células con receptores CD4; linfocitos T-4 y células accesorias de la inmunidad, mientras mayor sea el número de receptores en dichas células mayor serán las posibilidades de ser reconocidas e infectadas por el VIH.

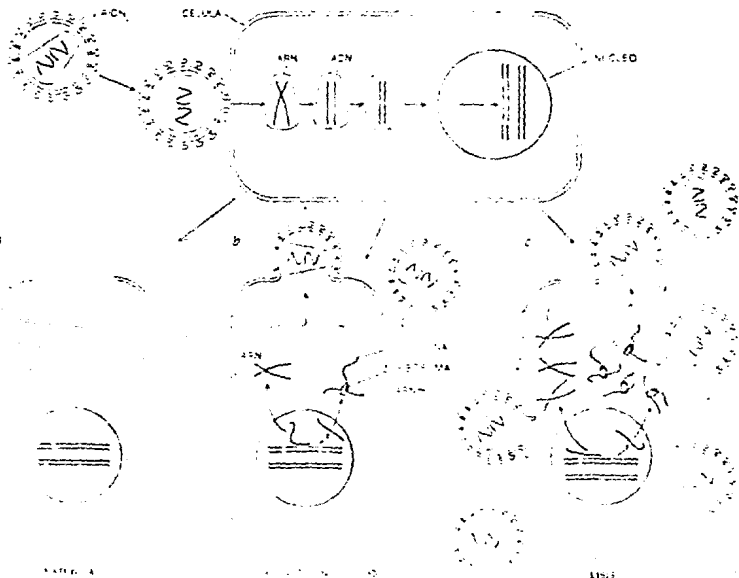
El número de receptores es muy variable y depende de varios factores: de la presencia de infecciones diversas por diferentes agentes virales tales como citomegalovirus y herpesvirus simple. Dado que el VIH utiliza esencialmente los mismos mecanismos de transmisión que los citados virus, los individuos infectados por éstos, tienen mayor riesgo de exponerse al VIH dado que además sus células serán más ricas en receptores CD4 que otras personas previamente sanas. Esto explica en parte la razón por la cual la promiscuidad constituye un factor de riesgo para adquirir el SIDA.

El VIH una vez adherido al receptor CD4 fusiona su envoltura a la membrana de la célula huésped y envía sus dos cadenas de RNA y transcriptasa reversa al citoplasma de la célula atacada para ahí sintetizar dos cadenas de DNA viral convirtiéndose en provirus. El DNA proviral viaja al núcleo de la célula huésped en donde se integra a el propio DNA celular

En ese momento pueden ocurrir las siguientes fases:

- a) el provirus puede permanecer en estado latente sin dar señales de su presencia.
- b) Alternativamente puede ordenar a los mecanismos celulares la copia de sus genes en forma de RNA; algunos de los cuales se traducirán en proteínas víricas en los ribosomas. Las proteínas y el RNA adicional se ensamblan a continuación para dar lugar a más viriones, que saldrán de la célula por un mecanismo similar a la gemación. Todo este proceso -- puede ser lento originando tan sólo un descenso de la actividad metabólica del huésped.
- c) Ó puede darse con tal rapidez que la célula se lise y libere los virus al exterior. Los nuevos virus toman para su envoltura parte de la membrana celular de la célula huésped por tanto la envoltura se compone de moléculas propiamente virales producidas bajo control del gen "env" como de la misma célula huésped. (6,7).

FIGURA No. 3

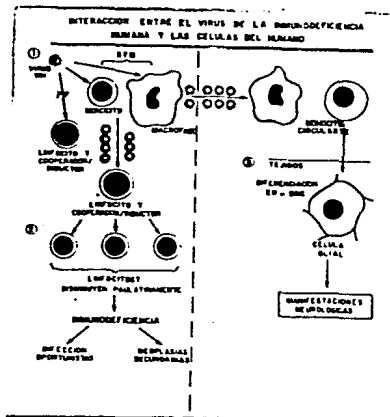


Características de la interacción entre el VIH y las células humanas.

Una vez que el virus ha ingresado al organismo:

- 1) las células del SFM (macrófagos fijos en tejidos, libres o monocitos circulantes), serían las primeras en afectarse. Estas células poseen la molécula receptora CD4 y son más abundantes que los linfocitos T. No se sabe si en esta primera etapa también pueden afectarse los linfocitos T, ya que las posibilidades de contacto con el virus deben ser más reducidas.
- 2) La progenie viral replica en estas células, ahora mucho más abundante infectaría otras células del SFM y linfocitos T cooperadores y efectores. La disminución progresiva de estos linfocitos determinará la inmunodeficiencia celular característica de los pacientes con SIDA, desarrollándose entonces la enfermedad.
- 3) Las células del SFM infectadas, en particular los monocitos, se distribuirán por todo el organismo diferenciándose en los macrófagos tisulares. Al llegar al sistema nervioso central, se convertirían en células de la microglia infectándose posteriormente otras células de sostén, determinando las manifestaciones neurológicas que se observan en algunos pacientes.

FIGURA No. 4



Patogenia.

El ataque del VIH a los linfocitos T4 ocasiona una disminución cuantitativa de éstos, lo que motiva pérdida del control de la respuesta inmune provocando:

- a) un deterioro en la respuesta de anticuerpos de la célula B, debido a que las células T-cooperadoras activan a las células B para producir anticuerpos y las dirigen en cuanto que deben producir exactamente para reaccionar con un antígeno específico. Las células T también aumentan la producción de las células B.
- b) un agotamiento de células T-cooperadoras reducirá la respuesta de las células citotóxicas y T-supresoras del antígeno
- c) La falta de células T-cooperadoras originan una disminución en la producción de sustancias conocidas como linfocinas que activan los diversos leucocitos incluyendo los linfocitos.

Generalmente hay un porcentaje superior de células cooperadoras que supresoras, en el SIDA esta relación es inversa por la pérdida de T4.

En consecuencia a lo anterior y debido a que esta respuesta celular es la afectada en mayor proporción, existe mayor riesgo a infecciones por microorganismos intracelulares como citomegalovirus, herpesvirus, Mycobacterias así como hongos: Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Pneumocystis carinii y también la infección de Histoplasmosis o Sarcoma de Kaposi(8).

El otro grupo de células atacadas por el VIH corresponde al de las células accesorias de la inmunidad antes mencionadas, las cuales tienen como función procesar antígenos y presentarlos en forma adecuada a las células encargadas de llevar a cabo el rechazo inmunológico. El daño de dichas células contribuye a explicar varios problemas relacionados con la patogenia de la enfermedad:

- 1) Coadyuva a agravar el estado inmunológico del paciente.
- 2) Actúa como reservorio del VIH en la etapa de latencia.
- 3) Sirve como vehículo para transportar al VIH a otros sitios del organismo por vía linfática y sanguínea.
- 4) Contribuye con el mecanismo de transmisión sexual(9).

Evolución de la infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana.

El conocimiento sobre la historia natural de la infección por el VIH ha evolucionado a medida que se ha avanzado en las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Transmisión del VIH. La transmisión se efectúa por las siguientes vías: sangre o semen infectados, transfusión de productos sanguíneos y transmisión perinatal o transplacentaria.

Seroconversión, infectados e infectantes. En la actualidad la detección de anticuerpos es la forma más práctica de detectar cuando un sujeto ha tenido contacto con el virus. El tiempo de incubación para la formación de anticuerpos se considera que oscila entre 6 a 8 semanas, aunque puede ser variable. Desde el punto de vista de salud pública es importante hacer énfasis en que los sujetos con anticuerpos positivos se consideran infectados e infectantes.

Infección aguda. Poco tiempo después de que se ha tenido contacto con el VIH es posible que se presente un síndrome similar al de la mononucleosis infecciosa - este corresponde a la infección primaria, se requiere la seroconversión del VIH. Una vez resuelto el cuadro clínico agudo estos sujetos cursan asintomáticos o su evolución hacia otro estadio.

Infección asintomática. Se considera en este grupo a aquellos sujetos en los que se detectan niveles de anticuerpos y que no han presentado manifestaciones clínicas de la enfermedad. Pueden cursar o no con alteraciones de laboratorio como linfopenia, trombocitopenia o disminución en el número de linfocitos cooperadores.

Linfadenopatía generalizada persistente. Las personas de este grupo presentan - crecimientos ganglionares mayores de un cm., en dos o más sitios, excluyendo - las regiones inguinales, con duración mayor a tres meses. A continuación se consideran otros cuatro grupos, que no son excluyentes y en los que los pacientes pueden tener sintomatología diversa, desde leve hasta grave.

Enfermedad constitucional o Complejo Relacionado al SIDA. En este grupo se clasifican aquellos enfermos que presentan sintomatología inespecífica como fiebre - y/o diarrea persistente por más de un mes, pérdida de peso involuntaria mayor al 10%, en ausencia de algún otro padecimiento que lo explique.

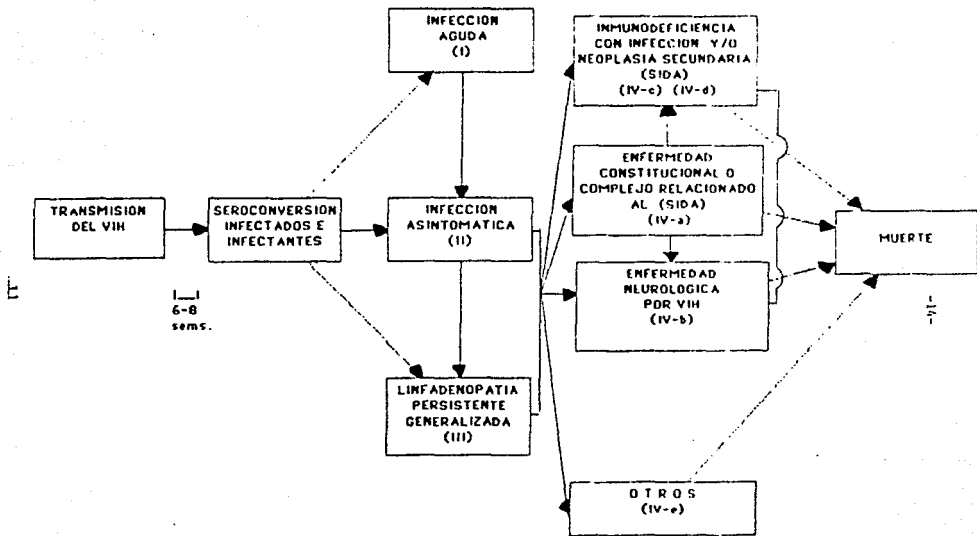
Inmunodeficiencia con infección y/o neoplasia secundaria. Este grupo es el que -- tradicionalmente se ha considerado con fines de vigilancia epidemiológica. La manifestación principal es un padecimiento infeccioso o neoplásico que indica inmunodeficiencia celular, en ausencia de alguna otra enfermedad que la explique. Algunos casos requieren de serología positiva para considerarlos en este grupo.

Enfermedad neurológica por el VIH. El cuadro clínico de estos sujetos puede tener tres variantes:

- 1) encefalitis subaguda manifestada por demencia.
- 2) mielopatía, en la que se presenta paraparesia progresiva, acompañada por - ataxia, aspasticidad e incontinencia y;
- 3) neuropatía periférica manifestada en tres subtipos,
 - 3.1 un cuadro de neuropatía sensorial dolorosa que afecta los núcleos dorsales.
 - 3.2 Neuropatía multifocal que se observa tanto en pacientes con SIDA como en pacientes con complejo relacionado al SIDA y.
 - 3.3 Neuropatías desmielinizantes similares a las del síndrome de Guillain-Barré, y que se han correlacionado a un fenómeno autoinmune.

Otros. En este grupo se incluyen otras condiciones clínicas que no pueden clasificarse en los rubros previos dado el desconocimiento que se tiene de otras manifestaciones de la enfermedad.

EVOLUCION DE LA INFECCION POR EL VIH



CUADRO No. 3

3 - 5 años

1.3 TRANSMISION DE LA INFECCION POR VIH

Son tres los mecanismos principales de transmisión del VIH:

- A) Por contacto directo sexual, tanto homosexual como heterosexual de hombre a mujer como de mujer a hombre.
- B) Transmisión a través de la sangre y hemoderivados, siendo la transmisión sanguínea el mecanismo más frecuente de este grupo.
- C) El transplacentario, que puede ocurrir durante el embarazo a través de la placenta, durante el parto y el posparto.

Transmisión sexual.

Los factores que determinan la ocurrencia de transmisión por contacto sexual directa son las siguientes:

Fuente de infección, la contribuyen los individuos infectados.

Vía de salida del virus, las diferentes secreciones de donde se ha aislado el virus; sangre, semen y secreciones vaginales.

Viabilidad del virus, el VIH es un retrovirus sumamente lábil a las condiciones del medio ambiente, lo que explica sólo puede ser transmitido por vía directa.

Vía de entrada, la transmisión directa sexual hombre a hombre, hombre a mujer y mujer a hombre. La eficiencia de transmisión no es igual en todos los casos.

- a) Coito anal, las relaciones sexuales en las que existe penetración peniana por el recto son las que implican mayor riesgo de transmisión, así como prácticas que producen laceraciones en la mucosa rectal como la aplicación de enemas rectales pre y poscoito. Se asocian a un riesgo importante de transmisión.
- b) Coito vaginal, es menos efectiva que el coito anal, esto es debido a las características anatomofisiológicas de la mucosa vaginal. Es muy probable que el riesgo de infección aumenta durante el período menstrual.(10)

Grado de exposición al riesgo, se desconoce el número exacto de exposiciones necesarias para una transmisión efectiva del VIH por vía sexual, pero se ha documentado casos atribuibles a un solo contacto y se sabe que el riesgo -- aumenta en función de las siguientes variables: número de parejas sexuales, número de contactos , tipo de prácticas sexuales y no utilización del condón.

Transmisión transfusional.

La aparición de casos de SIDA en receptores de productos sanguíneos y la incidencia de infección en los donadores de dichos productos fue uno de los primeros indicadores de la naturaleza infecciosa de la enfermedad.

La transmisión sanguínea del VIH ocurre en las siguientes situaciones:

- a) recepción de sangre o sus productos contaminados con VIH
- b) utilización de agujas y jeringas inadecuadamente esterilizadas
- c) por punción ocupacional.

Los componentes implicados en este tipo de transmisión son la sangre total, paquetes celulares (eritrocitos, plaquetas y leucocitos), el plasma y los factores de coagulación VIII y IX.

Transmisión transplacentaria.

La transmisión del VIH de una madre a su hijo puede ocurrir por tres mecanismos;

- 1) transplacentaria, durante el embarazo se ha demostrado la infección por VIH en tejidos de feto de 15 semanas de gestación.
- 2) durante el parto al existir contacto de la sangre de la madre con la del niño en donde puede ocurrir la transmisión del VIH.
- 3) Trasmisión posparto a través de la leche materna.(11).

1.4 EPIDEMIOLOGIA.

Desde que se informó en 1981 la pandemia del SIDA la magnitud potencial de la misma se ha recibido con cierto escepticismo e indiferencia. Aunque la pandemia se encuentra todavía en sus primeras etapas y sus dimensiones finales son difíciles de juzgar, no cabe duda de la amenaza sin precedentes que el SIDA constituye para la salud mundial.

Se habla en la actualidad de más de 157,191 casos de SIDA en 1988 registrados (4) en casi 150 países del mundo, sin embargo el número de infectados por el virus se estima de aproximadamente de 5 millones de personas.

Tan grave pronóstico se basa en los numerosos estudios epidemiológicos que han permitido establecer las pautas actuales de distribución del virus responsable de la inmunodeficiencia humana, SIDA.

La Organización Mundial de la Salud(OMS), a través del programa de lucha contra el SIDA, gracias a los cuales se ha definido un esquema global de distribución mediante una coordinación de controles y registros de casos de SIDA. Puesto que la infección por VIH puede preceder en varios años al desarrollo de la enfermedad, no se debe limitar a los casos de SIDA declarados si se quiere conseguir una buena panorámica de la distribución actual; es necesario además estudiar datos sobre el número o proporción de gente que ha contraído el virus.

El análisis de dichos datos y de las informaciones relativas al SIDA han permitido reconocer tres grupos en la distribución mundial de la enfermedad.

El grupo uno característico de los países industrializados con un número elevado de casos declarados entre ellos: Estados Unidos, Canadá, Brasil, México parte de Europa occidental, Australia, Nueva Zelanda y ciertas zonas de Iberoamérica pertenecen a este grupo en donde el VIH empezó a generalizarse probablemente a fines de los años 70.

La mayoría de los casos se da en varones homosexuales y bisexuales y consumidores de drogas por vía intravenosa(principalmente en E.U.), los casos debido a las transfusiones de sangre o productos hemoderivados se dieron a partir de 1970. En este grupo la relación hombre/mujer es de 10:1 a 15:1 y la transmisión transplacentaria no es todavía un fenómeno frecuente(13).

El grupo dos se observa en zonas de Africa meridional, central y oriental y con intensidad creciente en ciertos países Iberoamericanos especialmente en el Caribe. Los países de este grupo presenciaron el comienzo de la propagación general del virus después de los años 70. La mayoría de los casos se da entre heterosexuales. La transmisión entre homosexuales y drogadictos por vía intravenosa no existe o su nivel es muy bajo.

Puesto que hay un gran número de mujeres infectadas la transmisión transplacentaria es frecuente. La relación hombre/mujer es 1:1

En el grupo tres predominan los países de Europa oriental, norte de Africa, Oriente medio y Asia. En estos países el VIH se introdujo, probablemente, - entre principios y mediados de los años 80.

Ahí el número de casos registrados actualmente es muy bajo. Suele afectar a gente que ha viajado a zonas del grupo uno o dos y han permitido relaciones sexuales con individuos infectados.(4).

Ante la urgencia exigida por la situación, se ha creado el Programa Mundial de lucha contra el SIDA, coordinado por la OMS, este programa tiene tres objetivos básicos:

- a) Impedir nuevas infecciones por el virus.
- b) Suministrar apoyo y cuidado a cuantos estén ya infectados contra el SIDA.
- c) Y aumentar los esfuerzos nacionales e internacionales contra el SIDA.

En América la infección por el VIH ya ha quedado bien establecida con transmisión autóctona en 44 de los 46 países. Son 108,830 casos de SIDA notificados en América informados a la OMS a excepción de Montserrat y las Islas Vírgenes, hasta el 1° de Junio de 1989, ocupando los cinco primeros lugares los siguientes países: Estados Unidos(92719), Brasil(5712), Canadá(2449), México (2155), y Haití(1549).

En México los estados más afectados son el Distrito Federal, Jalisco, Edo. México, Nuevo León, Coahuila, Puebla y Baja California.

Y la transmisión sexual es predominante en hombres homosexuales y bisexuales, la transmisión transfusional se da en la mayoría de los estados en menor grado. La edad promedio con mayor riesgo al VIH es de 25 a 44 años. la relación hombre / mujer es de 8:1.

1.5 DIAGNOSTICO SEROLOGICO DEL VIH.

Las técnicas de laboratorio para la identificación de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana tienen las siguientes aplicaciones:

- A) Investigación de anticuerpos contra el VIH para el diagnóstico clínico.
- B) Presencia de anticuerpos contra VIH en sangre, hemoderivados y plasma
- C) En donantes de Órganos: presencia del VIH.
- D) En donantes de Semen: presencia del VIH.
- E) Para evaluación de estudios epidemiológicos.
- F) Evaluación de métodos para presencia y tratamiento del SIDA.

En el diagnóstico serológico se tienen pruebas de detección primaria y de confirmación. En las primeras se incluyen los métodos inmunológicos como ELISA, RIA y -- Hemaglutinación. En las confirmatorias se tienen a Inmunofluorescencia Indirecta y Western Blot.

En los laboratorios de detección primaria se investiga la presencia de anticuerpos contra el VIH empleando el método inmunoenzimático ELISA generalmente. Pruebas de confirmación, todas las pruebas repetidas positivas por ELISA serán sujetas a confirmación utilizando cualquiera de las dos técnicas antes mencionadas para este fin ; la técnica de Western Blot es ejemplo de este tipo de pruebas y que se utilizará en este trabajo.

ASPECTOS IMPORTANTES DEL INMUNOANÁLISIS ENZIMÁTICO (ELISA).

La prueba de inmunoanálisis enzimático fué propuesto por primera vez por Van Weemen y Schuurs (1971) y Engvall y Perman, combinando el uso de antígenos o anticuerpos inmóviles sobre una fase sólida con un antígeno o anticuerpo conjugado a una enzima que dan como resultado un análisis con alta sensibilidad y especificidad.

El principio básico de esta prueba es que el antígeno o anticuerpo se adhiere a un soporte en donde se lleva a cabo la reacción enzimática.

La ventaja del método ELISA es que por una parte se puede automatizar o emplear equipo complicado.

Existen diferentes tipos de ensayos de ELISA que se utilizan para detectar antígenos o anticuerpos, según el caso, los más usados son: método directo y método del doble anticuerpo (sandwich) que tiene una inmensa gama de variantes. El método directo se emplea para detectar y medir cantidades de anticuerpos específicos contra un antígeno, usando la fase sólida con el mismo; el método del doble anticuerpo se utiliza para detectar antígenos usando anticuerpos específicos o lo contrario.

La fase sólida aplicada a los ensayos tipo ELISA, se realizan con materiales plásticos como poliestireno aunque también pueden emplearse materiales como partículas de celulosa, poliacrilamida, dextranos, silicón y vidrio micro cristalino. La forma de la fase sólida no es tan importante, pero una gran área superficial de ésta tiene ventajas con respecto a los volúmenes usados de esta fase es que el antígeno o el anticuerpo se unen perfectamente y de manera homogénea, eficaz, irreversible y la inmunorreactividad del antígeno o del anticuerpo adsorbido no debe ser alterada en forma significativa.

Los materiales para la técnica de ELISA son poliestireno o polivinilo y al parecer se adhieren mejor a un plástico que a otro.

La sensibilidad de las técnicas inmunoenzimáticas dependen en gran parte de la preparación de los conjugados enzima-antígeno o enzima-anticuerpo.

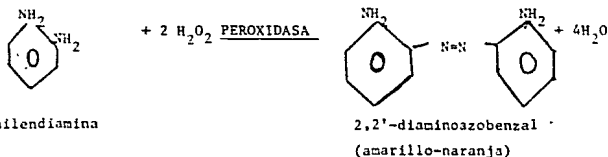
El conjugado utilizado en los análisis tipo ELISA indirectos consisten en un anti-inmunoglobulina a la cual se le ha pegado una enzima, las más usadas para este fin son: galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa, entre otras. Todas ellas con excelentes cromógenos como peróxido de hidrógeno con ortofenilendiamina para la peroxidasa y parafenilfosfato para la fosfata - alcalina(15,16).

Todas las reacciones de acoplamiento informadas proveen conjugados hetetoge -- neos, es decir, además de contener uniones enzima-proteína y proteína-proteína. El objetivo de los procesos de unión de la enzima a la proteína es que el conjugado producido retenga la mayor parte de la actividad inmunitaria y enzimática (la actividad enzimática no es inhibida durante la reacción antígeno-anticuerpo).

Las enzimas más usadas en las técnicas de tipo ELISA es la peroxidasa debido a su bajo costo y facilidad de obtenerla en comparación con otras enzimas.

En la mayoría de los casos se utilizan sustratos cromógenos que al inicio son incoloros y posteriormente por degradación, desarrollan color fuerte.

Idealmente estos sustratos rinden productos completamente solubles y con alto coeficiente de extinción. Para detectar peroxidasa se usa una gran variedad de cromógenos tomando como sustrato al peróxido de hidrógeno, tales pueden ser : diaminobencidina, ácido 5-aminosalicílico, ortodianisida y ortofenilendiamina. La cinética de la reacción catalítica de la peroxidasa se ha investigado en presencia del sustrato (H_2O_2) y el cromógeno ortofenilendiamina, originado la siguiente reacción



El resultado final de la técnica de ELISA puede ser leído a simple vista o bien usando un espectrofotómetro. Es importante la presencia de controles negativos y positivos.

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA.

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

De acuerdo a la literatura mundial las pruebas más usadas para la detección de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana, son las del tipo - inmunoenzimático ELISA, Inmunofluorescencia Indirecta y Western Blot.

Existen en la práctica una gran variedad de técnicas de ELISA, para este fin. Aún cuando aparentemente todas refieren una sensibilidad y especificidad aceptable se considera que es importante una evaluación profunda de la técnica, - dado la implicación biológica, social y económica que tiene para la detección del SIDA.

2.2 JUSTIFICACION DEL PROBLEMA.

Debido a que la enfermedad del SIDA se ha convertido en un problema de salud pública ya que afecta principalmente a personas de edad productiva es necesario tomar medidas preventivas urgentes, con el fin de detectar a personas infectadas portadoras sintomáticas y asintomáticas del virus de la inmunodeficiencia humana que pudieran seguir transmitiendo al virus.

2.3 OBJETIVOS.

- 1.- Evaluar la especificidad y sensibilidad de la técnica inmunoenzimática ELISA segunda generación, para la detección de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana(VIH).
- 2.- Hacer estudio comparativo de la especificidad y sensibilidad entre los resultados positivos con ELISA y Electroinmunotransferencia (Western Blot).
- 3.- Evaluar muestras positivas de Factor reumatoide, anticuerpos antinucleares, anticuerpos herpes virus y anticuerpos citomegalovirus con su posible reacción cruzada con el virus de la inmunodeficiencia humana.

2.4 HIPOTESIS

La técnica de ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana puede considerarse una técnica con una alta sensibilidad y especificidad.

3.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAL

- Algodón
- Gradilla
- Jeringas
- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas graduadas de 1,5,10 ml.
- Probetas graduadas de 50 y 100 ml.
- Tubos de ensayo de 13X100.
- Pipetas de desplazamiento positivo de 10, 200, 400 µL

3.2 EQUIPO

- Baño María : Rios-Rocha S.A.
- Agitador mecánico : YANKEE CLAY ADAMS.
- Centrífuga : DAKON/ICE DIVISION.
- Espectrofotómetro(a 492 nm.):QUANTUM II ABBOTT.
- Refrigerador(a 4 °C): NIETO.
- Termómetro(-10 a 150 °C.)
- EQUIPO ABBOT HIV ELA RECMBINANTE ELISA.
- EQUIPO DUPONT/BIOTECH HIV WESTERN BLOT

3.3 MATERIAL BIOLÓGICO.

- Sueros de pacientes donadores de sangre
- Sueros de pacientes con SIDA confirmado
- Sueros de pacientes hemofílicos
- Sueros de pacientes homosexuales
- Sueros de pacientes con anticuerpos antinucleares positivo
- Sueros de pacientes con anticuerpos herpes virus
- Sueros de pacientes con anticuerpos citomegalovirus
- Sueros de pacientes con Factor Reumatoide positivo.

3.4 REACTIVOS

EQUIPO ELISA (segunda generación) ABBOT. HIV. EIA RECOMBINANTE.

Ensayo inmunoenzimático in vitro.

- Esferas recubiertas del antígeno VIH.
- Frascos de concentrado de conjugado antiIgG humana de cabra: peroxidasa de rábano picante:: tampón TRIS y colorante rojo.
- Diluyente del conjugado contiene suero bovino y de cabra.
- Control positivo: plasma humano inactivado, positivo para el VIH.
- Control negativo: plasma humano negativo para el VIH.
- Diluyente de muestra: contiene suero bovino y de cabra.
- Tabletas de OPD (o- fenilendiamina.2HCl.) por tableta 12.8mg.
- Diluyente de OPD: tampón de citratos-fosfatos con 0,02% de peróxido de Hidrógeno.
- Acido Sulfúrico 1N.

EQUIPO WESTERN BLOT. BIOTECH/DUPONT HIV.

Ensayo de Inmunoelectrotransferencia.

- Tiras de nitrocelulosa que contiene proteínas antigénicas - del VIH purificadas e inactivadas.
- Control positivo: suero humano inactivado positivo para el VIH.
- Control ligeramente positivo: suero humano inactivado que contiene un título bajo de anticuerpos contra VIH.
- Control negativo: suero humano no reactivo al VIH.
- Buffer de lavado: concentrado de 20X que cuando se diluye contiene 0.02M TRIS, 0.1M NaCl.
- Buffer Blotting, concentrado de 10X de 0.02 de TRIS.
- Conjugado 1, anti IgG(cabra).
- Conjugado 2, AVIDINA conjugado con peroxidasa.
- Sustrato A, 7.8 mM de solución de 4-cloro-1-naftol en solución de alcohol.

3.5 METODOS.

3.5.1 Técnica Inmunoenzimática ELISA

ABBOTT HIV EIA RECOMBINANTE.

Esta técnica utiliza un sistema de detección en el cual las esferas son recubiertas de antígenos VIH CORE y ENV, derivados del DNA recombinante.

Las esferas recubiertas se incuban con un diluyente de muestras y con suero o plasma humano, y con los controles apropiados.

Los anticuerpos contra los antígenos VIH CORE y ENV, presentes en la muestra se unen a los antígenos VIH de la fase sólida. Después de la aspiración del material no unido y del lavado de las esferas, se incuba el complejo antígeno-anticuerpo de la esfera con anticuerpo anti-IgG humana de cabra, conjugado a peroxidasa de rabano picante: (HRPO:anti-IgG humana)

El conjugado enzimático no unido se aspira y las esferas se lavan.

A continuación se agrega una solución de O-fenilendiamina (OPD) que contiene peróxido de hidrógeno a las esferas.

La reacción de la solución de sustrato OPD con HRPO produce un color amarillo-anaranjado, cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-VIH presentes en la muestra.

La reacción enzimática se suspende agregando ácido sulfúrico 1N y la intensidad del color formado se mide usando un espectrofotómetro colocado a 492nm.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

- Distribuir 10 µl de cada control o muestra en el fondo de las cavidades correspondientes en la placa de reacción (2 controles negativos y 3 controles positivos).
- Distribuir 400 µl de diluyente de muestras en cada cavidad que contiene un control o una muestra.
- Añadir cuidadosamente una esfera en cada cavidad que contiene un control o una muestra.
- Cubrir con un folio adhesivo. Agitar vigorosamente la placa para mezclar muestras y esferas.
- Incubar a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 ± 2 minutos.
- Retirar el folio adhesivo y desecharlo. Aspirar el líquido y lavar cada esfera tres veces con 4 a 6 ml de agua destilada o desionizada.

- Pipetear 200 μ l de conjugado diluido en cada cavidad que contiene una esfera.
- Cubrir con un nuevo folio adhesivo. Golpear la placa para que el líquido cubra las esferas.
- Incubar a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 ± 2 minutos.
- Retirar el folio adhesivo y desecharlo. Aspirar el líquido y lavar cada esfera tres veces con agua destilada o desionizada.
- Transferir inmediatamente las esferas a tubos de ensaye debidamente identificados.
- Pipetear 300 μ l de solución de sustrato OPD recién preparada en dos tubos vacíos(blancos de sustrato) y después en cada tubo que contiene una esfera.
- Cubrir e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Agregar 1 ml. de ácido sulfúrico 1 N. a cada tubo.
- Ajustar a cero del espectrofotómetro con un blanco de sustrato a 492nm.
- Determinar la absorbancia de los controles y de las muestras a analizar

INTERPRETACION DE LA TECNICA.

El ABBOTT HIV EIA RECOMBINANTE detecta los anticuerpos dirigidos directamente contra los dos grupos principales de proteínas del VIH: las de la envoltura y las del grupo viral. El gen "env" aporta el código de síntesis de una glicoproteína precursora de aproximadamente 160 Kilodalton (Kd), que es procesada para producir dos glicoproteínas de aproximadamente 120 Kd y 41 Kd. El gen "gag" (o gen "core") codifica una proteína precursora de 55 Kd que da origen a tres proteínas de 24 Kd, 17 Kd, Y 15 Kd respectivamente.

Cálculos.

Si se emplea el analizador Quantum todos los cálculos se efectúan en forma automática. Si no se usa se realizarán los resultados de la siguiente manera: La presencia o ausencia del anticuerpo anti VIH se determina comparando la absorbancia de la muestra con un valor límite.

Este valor límite es igual a la absorbancia promedio de los controles negativos más 0.15 veces el promedio de los controles positivos.

Para que el ensayo sea válido, es necesario que la diferencia entre los valores promedio de los controles positivos y negativos (P-N) sea igual o mayor a 0.400. Si esto no ocurre, se sospechará de una falla técnica y el ensayo deberá repetirse. Si el valor P-N es persistentemente bajo, deberá sospecharse la descomposición de los reactivos.

1.- Cálculo de la absorbancia promedio del control negativo $NC\bar{x}$.

Determinar el promedio de los valores de los controles negativos.

Ejemplo:

control neg.	absorbancia
1	0.080
2	0.096
<hr/>	<hr/>
TOTAL	0.176

$$\frac{\text{absorbancia total}}{2} = \frac{0.176}{2} = 0.088 (NC\bar{x}).$$

Los valores individuales de los controles negativos deben ser iguales o inferiores a 0.200 e iguales o superiores a 0.010 y deberán caer dentro del rango de 0.5-1.5 veces el promedio de los controles negativos si un valor se encuentra fuera de este margen la prueba deberá repetirse.

2.- Cálculo de la absorción del control positivo $PC\bar{x}$.

Ejemplo:

Control pos.	absorción
1	0.835
2	0.925
<u>3</u>	<u>1.015</u>
TOTAL	2.775

$$\frac{\text{Absorción total } 2.775}{3} = 0.925 \text{ (PC}\bar{x}\text{)}$$

Los valores individuales de los controles positivos que no caen dentro del rango de 0.400 a 1.999 deberán ser descartados del cálculo del promedio.

Cálculo del valor límite.

$$\text{Valor límite} = NC\bar{x} + (0.15 \times PC\bar{x})$$

Ejemplo: $NC\bar{x} = 0.088$, $PC\bar{x} = 0.925$ V.Límite = $0.088 + (0.15 \times 0.925) = 0.227$

4.- Cálculo de la diferencia P-N.

Ejemplo: $NC\bar{x} = 0.088$ $PC\bar{x} = 0.925$ $P-N = (0.925 - 0.088) = 0.837$

Para que el ensayo sea válido, el valor P-N deberá ser igual o superior a 0.400. Si esto no ocurre, deberá sospecharse una falla técnica o una descomposición de los reactivos y deberá repetirse el ensayo.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

- 1.- Las muestras con valores de absorción inferiores al valor límite son negativas de acuerdo a los criterios de la prueba ABBOT
- 2.- Las muestras con valor de absorción iguales o superiores al valor límite son reactivas de acuerdo a los criterios de la prueba. Deberán repetirse antes de la interpretación usando la fuente original.
- 3.- Las muestras que hayan sido encontradas repetidamente reactivas se consideran positivas para el anticuerpo contra el VIH.
- 4.- Las muestras inicialmente reactivas que resulten negativas después de la repetición deberán volverse a analizar.

3.5.2 Técnica de Inmunolectrotransferencia.

Western Blot. BIOTECH/DUPONT HIV.

Esta técnica se basa en la propagación del VIH en una línea celular denominada H9/HTLV III_B de células de linfocitos T.

La parte purificada del virus es inactivada por tratamientos con luz ultravioleta. Las proteínas específicas son fraccionadas por electroforesis de acuerdo a su peso molecular en placa de gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio.

La separación de proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las tiras son lavadas para separar el material no deseado. Estas tiras de nitrocelulosa que contienen a las proteínas específicas del VIH separadas a lo largo de ellas se unen a los anticuerpos presentes en el suero positivo problema, utilizando además una inmunoglobulina IgG humana de cabra con Biotina y Avidina y un conjugado que contiene peroxidasa y 4-cloro-naftol.

Si los anticuerpos están presentes en la muestra, se presentan bandas en diferentes posiciones de la tira que corresponden a las proteínas del VIH : p17, p31, gp41, gp51, p55, p66, gp120, gp160.

PROCEDIMIENTO.

- Llevar los reactivos a temperatura ambiente.
- Añadir 2ml del diluyente del Buffer (amortiguador) para lavado a cada canal.
- Usando unas pinzas colocar cada una de las tiras de nitrocelulosa a cada canal.
- Incubar las tiras por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente aspirar el buffer y desecharlo.
- Añadir 2ml de buffer de trabajo a cada canal. Colocar la placa en el agitador por 5-10 minutos a temperatura ambiente en forma vertical.
- Añadir 20 µl de cada muestra y controles en el canal correspondiente.
- Cubrir la placa de reacción con su tapa y colocarla en el agitador mecánico de manera horizontal la agitación durante 18 a 24 Hrs.
- Quitar la tapa con cuidado evitando que las gotas de condensación no se mezclen.

- aspirar el líquido de los canales y lavar las tiras tres veces con buffer de lavado y agitar la placa durante cinco min. en cada lavado
- añadir 2ml. de conjugado No. 1 a cada canal, Incubar durante 60 min. a temperatura ambiente y con agitación constante.
- aspirar el conjugado No.1 de los canales, lavar cada tira tres veces
- añadir 2 ml. del conjugado No. 2 a cada canal. Incubar a temperatura ambiente durante 60 min. y con agitación constante.
- aspirar el conjugado No.2 de los canales y lavar las tiras .
- añadir 2 ml. de sustrato de trabajo y parar la reacción con agua descalcada.
- Comparar las tiras problema con las tiras de controles e identificar las proteínas presentes o no en el suero de cada problema.

INTERPRETACION DE LA TECNICA.

Primero en las tiras controles identificar las proteínas del VIH, que a lo largo de ellas se presentan como bandas coloreadas y que pertenecen a las proteínas específicas del VIH separadas de acuerdo a su peso molecular.

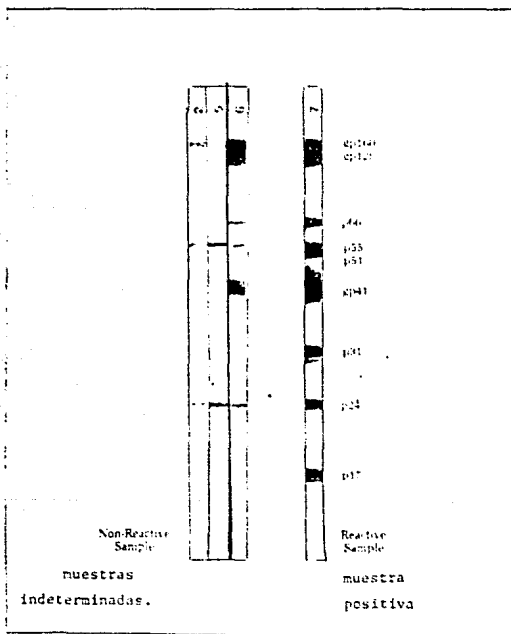
Segundo, cada banda se le asigna una reactividad en base a la intensidad de la coloración que presenten.

Tercero, las tiras son interpretadas de acuerdo a la combinación de las bandas presentes y reactivas. Figura 3.

INTERPRETACION DE LA TECNICA WESTERN BLOT PARA LA DETECCION DE
 ANTICUERPOS CONTRA VIH.-BIOTECH/DUPONT

TIRAS	INTERPRETACION	BANDAS PRESENTES
2	Indeterminado	p24, p55, gp160
5	Indeterminado	p24, p55
6	Indeterminado	p24, gp41, p55, p66, gp120, gp160
7	Positivo	p17, p24, p31, gp41, p51, p55 p66, gp120, gp160.

FIGURA No.5



SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO.

La validez de una prueba es el grado en que el resultado positivo de un procedimiento diagnóstico refleja la verdadera situación del enfermo. Para determinar la validez de una prueba es necesario analizar sus dos componentes: sensibilidad y especificidad.

La sensibilidad de un método de diagnóstico se refiere a la capacidad de la prueba de dar un resultado positivo cuando la persona analizada tiene la enfermedad. Cuando se aplica a una encuesta epidemiológica, la sensibilidad se refiere a la capacidad de la prueba de identificar correctamente a los enfermos o infectados que forman parte de una población.

La especificidad de un método de diagnóstico se refiere a la capacidad de la prueba para dar un resultado negativo si la persona no tiene la enfermedad o infección. Cuando se aplica a una encuesta epidemiológica, la especificidad representa la capacidad de la prueba de identificar correctamente en la población a las personas que no tienen la enfermedad o infección.

INDICADORES PARA EVALUAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE UNA PRUEBA PARA DETECCION O DIAGNOSTICO.

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{A}{A+C} \times 100$$

Donde : A= positivo verdadero
C= negativo falso
A+C= Total de enfermos o infec.

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{D}{B+D} \times 100$$

Donde : D= negativo verdadero
B= positivo falso
B+D= Total de no enfermos
o no infectados.

CRITERIOS DE INCLUSION.

- 1.- POSITIVO VERDADERO : ELISA POSITIVO Y WEATERN BLOT POSITIVO
- 2.- NEGATIVO FALSO : ELISA NEGATIVO Y WESTERN BLOT POSITIVO
- 3.- NEGATIVO VERDADERO : ELISA NEGATIVO Y WESTERN BLOT NEGATIVO
- 4.- POSITIVO FALSO : ELISA POSITIVO Y WESTERN BLOT NEGATIVO

ELISA: Técnica Inmunoenzimática.

WESTERN BLOT: Electroinmunotransferencia.

4.- RESULTADOS

4.1.- Resultados.

Los resultados obtenidos se agrupan de la siguiente manera:

Grupo A: Donadores de sangre.

- a) Se estudiaron 6249 donadores de sangre.
- b) Obteniéndose 10 donadores de sangre Positivos a ELISA.
- c) Y 6239 donadores de sangre Negativos a ELISA.
- d) A los 10 Positivos a ELISA se les realizó Western Blot resultando los 10 Positivos a Western Blot.
- e) De los 6239 Negativos a ELISA se tomarón 10 pacientes y se les -- realizó Western Blot resultando todos Negativos a Western Blot.

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{10}{10+10} \times 100 = 100\%$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{10}{10+10} \times 100 = 100\%$$

Grupo B : Pacientes con SIDA confirmado.

- a) Se estudiarón 18 pacientes con SIDA.
- b) Obteniendose los 18 Positivos a ELISA.
- c) Obteniendose los 18 Positivos a Western Blot.

De acuerdo a los criterios de inclusión para este grupo sólo se calcula la sensibilidad. Grupo Control.

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{18}{18+0} \times 100 = 100\%$$

Grupo C : Pacientes que pertenecen a grupos de alto riesgo, hemofílicos, homosexuales, con transfusiones sanguíneas

- a) Se estudiarán 1403 pacientes de grupo de alto riesgo.
- b) Obteniéndose 70 positivos a ELISA.
- c) Y 1333 Negativos a ELISA.
- d) De los 70 Positivos a ELISA se les realizó Western Blot obteniéndose Western Blot positivos 65.
- e) De los 1333 ELISA Negativos a 70 se les realizó Western Blot resultando los 70 Negativos a Western Blot.

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{65}{65+0} \times 100 = 100\%$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{70}{70+5} \times 100 = 93.3\%$$

Grupo D : Pacientes que pertenecen a patologías excluyendo a grupos de riesgo al SIDA.

- a) 12 pacientes con Factor Reumatoide Positivo, resultando los 12 Negativos a ELISA Y Negativos a Western Blot.
- b) 12 pacientes con Citomegalovirus Positivos, resultando los 12 Negativos a ELISA y Negativos a Western Blot.
- c) 12 pacientes con Herpesvirus Positivos, resultando los 12 Negativos a ELISA y Negativos a Western Blot.
- d) 14 pacientes anticuerpos antinucleares Positivo resultando los 14 Negativos a ELISA y Negativos a Western Blot.

Para el inciso a) y d) no se observaron banda alguna en las tiras reactivas, por lo tanto se descarta posible reacción cruzada con estas dos patologías.

Para el inciso b) y c) fueron negativos a Western Blot, sin embargo se observaron ciertas bandas en las tiras de reacción comparando con tiras control.

TABLA No. 1

Resultados de 7720 casos analizados en la técnica de ELISA
en la detección de anticuerpos contra el VIH.

GRUPO	DIAGNOSTICO	No. DE CASOS	No. DE POSITIVOS A ELISA	% FRECUENCIA
A	Donadores de sangre	6249	10	0.16
B	Diagnóstico de SIDA	18	18	100.0
C	Grupo de alto riesgo	1403	70	4.0
D	Factor reuma- toide positivo	12	0	0.0
	Anticuerpos antinucleares	14	0	0.0
	Citomegalovirus positivo	12	0	0.0
	Herpes virus positivo	12	0	0.0
	TOTAL	7720		

TABLA No.2

RESULTADOS DE 7720 CASOS ANALIZADOS COMPARANDO
LA TECNICA DE ELISA CON WESTERN BLOT.

GRUPO	ELISA		WESTERN BLOT		SENSIBI	ESPECI
	No. DE CASOS	No. DE POSITIVOS	No. CASOS	No. POSITIVOS	LIDAD'	FICIDAD
					%	%
A	6249	10	10	10	100	100
B	18	18	18	18	100	--
C	1403	70	70	65	100	93.3
D	50	0	50	0	--	--

TABLA No.3

RESULTADOS DE CASOS DE ELISA COMPROBANDO SU NEGATIVIDAD
CON WESTERN BLOT

GRUPO	ELISA		WESTERN BLOT	
	No. DE CASOS	No. NEGATIVOS	No. DE CASOS	No. NEGATIVOS
A	10	10	10	10
C	70	70	70	65

SUMA DE RESULTADOS DE WESTERN BLOT EN CIERTAS
PATOLOGIAS DIFERENTES AL SIDA.

TABLA No. 4

	No.de	No. de								
	estudios	bandas	p17	p24	p31	gp41	p51	p55	gp66	gp120/160
FACTOR										
REUMATOIDE	12	0	-	-	-	-	-	-	-	-
ACS										
ANTINUCLEARES	14	0	-	-	-	-	-	-	-	-
CITOMEGALOVIRUS	12	6	-	4	-	-	-	2	-	-
HERPESVIRUS	12	6	-	4	-	-	-	2	-	-

4.2 ANALISIS DE RESULTADOS.

Analizando los resultados obtenidos por grupos se tiene lo siguiente:

Grupo A: al estudiar 6249 Donadores de sangre, 10 de ellos resultaron positivos a la técnica de ELISA y a Western Blot.

Aquí podemos observar que en esta población de donantes se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100% lo que indica que se obtuvo realmente a los infectados del VIH y a los no infectados, para así tomar la decisión de rechazar o no al donante en cuestión. Además podemos decir que la técnica de ELISA puede estandarizarse como la técnica suficiente para eliminar las sangres que en un momento dado se requiere de ser transfundidas sin riesgo a infección por VIH.

Grupo B: Este grupo se consideró como grupo control para poder realizar la técnica de ELISA y Western Blot y comprobar con ello su alta y total sensibilidad de la primera.

Además de conocer a los infectados y enfermos de SIDA.

Grupo C: Se estudió 1403 pacientes considerados dentro del grupo de alto riesgo de los cuales resultaron 70 ELISA positivos y sólo 65 positivos a Western Blot.

A estos 65 se les consideró individuos infectados por el VIH, que se refleja en el 100% de sensibilidad obtenida. De acuerdo a la especificidad, aquí se presenta de 93.3% lo que indica que existe un 6.6% de esta población que está infectada con el VIH y que pertenece al grupo de alto riesgo.

Grupo D: Aquí se puede observar que ciertas enfermedades virales pueden tener bandas similares al VIH como los citomegalovirus y herpesvirus, sobre todo en bandas que corresponden a proteínas de corteza del virus como se muestra en la tabla No. 4, que son la p24, y p55, pero ello no contribuye a que exista una reacción cruzada entre estos virus, ya que para considerarse positiva la técnica de Western Blot es necesario contener el total de bandas características al VIH como lo son; p17, gp41, p55, p66, gp120, gp160, p24, p31, p51, y dar un resultado positivo en la técnica de confirmación lo cual es totalmente inequívoca para un diagnóstico verdadero.

4.3 CONCLUSIONES.

El diagnóstico de la infección con los virus de la inmunodeficiencia humana puede establecerse a través del aislamiento e identificación de los agentes causales en diferentes líneas celulares, mediante microscopía electrónica, niveles de transcriptasa reversa etc., sin embargo estos procedimientos son lentos, técnicamente difíciles y además costosos que requieren de instalaciones de alta seguridad y personal altamente calificado por lo que no puede realizarse en forma de rutina.

Otra alternativa en el diagnóstico de la infección por VIH, la constituye la demostración de anticuerpos hacia estos virus en las personas infectadas mediante la técnica de ELISA.

Actualmente existen en forma comercial una gran variedad de procedimientos serológicos con objeto de determinar anticuerpos al virus de la inmunodeficiencia humana.

Dada la importancia médica y social de un resultado positivo de anticuerpos al VIH en una persona, los cuales deben ser precisos y de interpretación correcta, se procedió a evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA la cual resultó aceptable en nuestro estudio y confirmada con la técnica de Western Blot.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fenner F., White O., Virología Médica, 2a. Edición,
La Prensa Médica Mexicana, México 1981.
- 2.- William A.H., Wong-Stall F., "Biología molecular del virus del SIDA"
Scientific American. 147:1988, 22-31.
- 3.- Koch, Michael. "The anatomy of the virus"
R.M. New Scientist, 33: 1987, 46-51.
- 4.- Allain J.P., Gallo C.R., Montagnier L. "Human Retrovirus and Diseases -
they cause" Symposium Highlights Chicago Illinois, May 1985, 4-12.
- 5.- Boletín Mensual del Sector Salud, CONASIDA, Editada por la
dirección General de Epidemiología. Año 1 No. 7 ; 129-133.
- 6.- Gallo C.R., Montagnier L., "El SIDA en 1988" .
Scientific American, 147: 1988 10-19.
- 7.- Stanislaniski E.H. "Virus de la inmunodeficiencia humana".
ICYT, Vol. 9 No. 132: 1987 15-17.
- 8.- Goodsmith J.M., Lange W.G., "Pathogenesis of HIV and its implications -
for serodiagnosis and monitoring of antiviral therapy",
J. Virol Meth. 17, 1987: 11-19.
- 9.- Redfield R., Burke D.S., "Infección por HIV: cuadro clínico."
Scientific American, 147 :1988, 82-89.

- 10.- Sepulveda A.J., et al, "Características Epidemiológicas y cognoscitivas de la transmisión del VIH en México." *Salud Pública, Mex*, 30, 1988: 513-527
- 11.- Ward J., Holmberg S., "Transmission of human immunodeficiency virus (HIV) by blood transfusions screened as negative for HIV antibody", *The New England of Medicine* 318, 1985: 473-477.
- 12.- Boletín Mensual de Salud, CONASIDA. Editado por la Dirección General de Epidemiología. Año 3 No. 6 1989: 677- 683.
- 13.- Mann M.J., Chin J., "The International Epidemiology of AIDS" *Scientific American*, 6, 1988: 60-71
- 14.- Ponce de León M. et al, "Los primeros años de la Epidemiología de SIDA en México." *Salud Pública Mexicana*. 30, 1988: 544- 554.
- 15.- Hernández L.J., Santos A.L., "Aspectos relevantes del Inmunoanálisis Enzimático (ELISA)". *Infectología* 2. 1985: 52-56.
- 16.- Barriga A.G., Castell T., "Diagnóstico serológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana." *Rev. Mex. Pat. Clin.* 35, 1988: 121-127.
- 17.- Fauci A.S. "Acquired immunodeficiency Syndrome *Annals of Internal Medicine* 1985: 1800-1813.
- 18.- Gallo C.R., "Human T-Cell Leukemia viruses (HTLV): A unique family of pathogenic Retroviruses". *Ann Rev. Immunol.* 3 1985: 321-326.
- 19.- James M., Cockerill P. "Subspecialty Clinics: Infectious diseases". *Clin. Proc.* 63 1988: 373-380.
- 20.- Weiss A., Hollander H. "Acquired immunodeficiency Syndrome: Epidemiology Virology and Immunology". *Ann Rev. Med.* 36, 1985: 545-562.

- 21.- Council."Status Report on the Acquired Immunodeficiency Syndrome".
JAMA Scientific Affairs, 254, 1985 :1342- 1345.
- 22.-Wess S H.,Guedert J.J.,"Screening test for HTLV-III (AIDS agent)
Antibodies:Specificity, sensitivity and applications"
JAMA,253, 1985 : 221- 225.
- 23.- Carlson J.R., Hinrichs S.H.," Evaluation of three comercial
screening tests for aids virus antibodies" Am.J. Clin.Pathol.
1986: 86 ; 357.
- 24.- U.S. Dep Health Hum.Ser."The impact of routine HTLV-III testing.
on public health.", 6-5,1-27,1986. U.S.Dep. Health H.S. Bethesda
M.D. U.S.A.
- 25.- M.M.W.R." Mortality Morbidity Weekly Report.C.D.C AtlantaC.Update
"Serologic Testing for Antibody to Human Immunodeficiency Virus".
M.M.W.R., 52, 1988: 833-845.
- 26.- Meyer K.B.,Parker S.G.,"Screening for HIV:Can we afford the false posi-
tive rate?".New Engl Jour Med. 317-4. 1987: 238-241.
- 27.- Tsang V.C., Palmer D.F."Enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot
technique(Western Blot) for HTLV-III antibodies".U.S. Dep. Health
and Human Serv. C.D.C. 1-24 Atlanta Georgia .30, 1985: 333. U.S.A.
- 28.- Gallo D.,Diggs J.L."Comparison of detection of antibody to the
acquired immunodeficiency syndrome virus by enzyme immunoassay,
immunofluorescence and Western Blot methods".J.Clin. Microb.
23-6. 1986: 1049- 1051.
- 29.- Karpas A."Unusual virus produced by cultured cells from a patient
with AIDS. Mol.Biol. Med. 1. 1983: 457-459.

- 30.- Maesing M., Douglas H.S. "Nucleic acid structure and expression of the human AIDS /Lymphadenopathy retrovirus" NATURE, 313, 1985: 450-458.
- 31.- London J. "Enzymeimmunoassay: techniques and uses". NATURE, 268, 1977: 483-484.
- 32.- Brain G.W. "Enzyme Immunoassay" Clin Chem 22-8, 1976: 1243-1255.
- 33.- Engvall E., "Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT" Methods in enzymology. 70, 1980: 419-439.
- 34.- Hermann E.J., "Enzyme-linked Immunoassay for the detection of microbiol. antigens and their antibodies". Advances in applied Microbiology. 31. 1986, :271-288.