



41
21.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INCIDENCIA DE VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA EN PACIENTES HEMOFILICOS
POSTRANSFUNDIDOS DEL INSTITUTO NACIONAL
DE PEDIATRIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ELIZABETH GUZMAN VAZQUEZ



MEXICO, D. F.,

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 esta 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.


JURADO ASIGNADO

Presidente Profra. PENICHE QUINTANA ELDA
Vocal Profra. NAVAS PEREZ AIDA
Secretario Prof. LEON CHAPA SATURNINO DE
1er. Suplente Profra. BONIFAZ ALFONZO LAURA CECILIA
2do Suplente Prof. ORTEGA SOTO ENRIQUE

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Laboratorio del Banco de Sangre del
Instituto Nacional de Pediatría
Secretaría de Salud

ASESOR


Dra. AIDA NAVAS PEREZ

ASESOR TECNICO


Dra. AMALIA DE BRAVO LINDORO

SUSTENTANTE


ELIZABETH GUZMAN VAZQUEZ

A DIOS

**EL HOMBRE CUERDO ENCUBRE LA CIENCIA;
MAS EL CORAZON DE LOS NECIOS PUBLICA
LA NECEDAD.**

PROVERBIOS 12 23

A MIS PADRES

RAQUEL Y JUAN

**POR QUE CON SU APOYO Y AMOR ME IMPULSARON
A CUMPLIR UNA META IMPORTANTE EN LA VIDA Y
DARME LA MEJOR HERENCIA.**

CON RESPETO, AMOR Y ADMIRACION

GRACIAS

A MIS HERMANOS

**XOCHITL, RAQUEL, NORMA, JUAN Y JOSE LUIS
POR SU APOYO EN MI FORMACION**

**ESPECIALMENTE A JUAN PORQUE DESDE NIÑO
FUE UN PILAR PARA LLEVAR A CABO MIS ESTUDIOS.**

A MIS SOBRINOS

ANDRES, CAROLINA, ORLANDO, IVAN Y RAQUEL
ESPERANDO QUE LOGREN LAS METAS QUE SE
PROPONGAN EN LA VIDA.

Y NATURALMENTE

A MYRIAM VILLANUEVA MENDEZ
CON RESPETO, CARISO Y ADMIRACION
GRACIAS.

A MIS AMIGOS

LOS DE HOY, LOS DE AYER Y LOS DE SIEMPRE,
UNO SOLO CONOCE A AQUELLOS A LOS QUE UNO
COMPRENDE REALMENTE.

Y UNO SOLO COMPRENDE POR COMPLETO A
AQUELLOS QUE REALMENTE LE SIMPATIZAN.

LIN YUTANG

MI AGRADECIMIENTO

A MI HONORABLE JURADO

A MI ASESOR

**Q.F.B. AIDA NAVAS PEREZ
POR SU PACIENCIA Y APOYO.**

A MI ASESOR TECNICO

**A LA DRA. AMALIA GPE. BRAVO LINDORO
POR SU APOYO.**

**A MIS MAESTROS
POR LOS CONOCIMIENTOS BRINDADOS**

**ESPECIALMENTE
A LA MAESTRA ELDA PENICHE QUINTANA
POR SU GRAN APOYO.**

INDICE

INTRODUCCION	1
Objetivos	3
Hipótesis	3
CAPITULO I	
RETROVIRUS	
1 - Características generales del retrovirus.	4
2 - Clasificación del VIH.	9
3.- Morfología del VIH.	10
4.- Propiedades Físico-Químicas del VIH.	17
5 - Patogenia y Patología	20
6 - Inmunidad	38
7 - Epidemiología del VIH.	40
8 - Diagnóstico	44
9 - Tratamiento	49
CAPITULO II	
HEMOFILIA	
1 - Características generales de la hemofilia.	50
1.1.- Generalidades	50
1.2.- Datos históricos	51
2.- Cuadro clínico	52
3.- Incidencia	52
4.- Herencia	53
5.- Diagnóstico	54
6.- Tratamiento	55
7 - Contaminación viral.	56
8.- Pronóstico	56
CAPITULO III	
DONADORES	
1.- Definición de un donador.	57
2.- Requisitos para ser donador.	57
3.- Legislación para la donación.	58

**CAPITULO IV
PARTE EXPERIMENTAL**

1.- Diagrama de flujo	61
2.- Material	62
2.1.- Material biológico	62
2.2.- Material de laboratorio	62
2.3.- Reactivos de laboratorio	63
2.4.- Reactivos de diagnostico	63
2.5.- Equipo de laboratorio	64
3.- Metodología	64
3.1.- Recolección y manejo de la muestra	64
3.2.- Parámetros y desarrollo del estudio	65
3.2.- Rapid - Elavia	66
3.3.- Genelavia - Mixt	72
3.4.- New Lav - Blot	77

**CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

1.- Resultados	82
2.- Discusión de resultados	87

CONCLUSIONES	88
---------------------	-----------

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA	90
---------------------	-----------

INTRODUCCIÓN:

En el presente estudio se reporta la incidencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en pacientes hemofílicos postransfundidos del Instituto Nacional de Pediatría (INP) los resultados que se muestran, se basan en datos obtenidos en forma retrospectiva de 1993 a la fecha, este estudio se llevó a cabo en pacientes que únicamente han sido transfundidos con componentes sanguíneos obtenidos de donadores familiares que acuden al Banco de Sangre del INP esto se debe a que los tratamientos disponibles comercialmente para este padecimiento son de elevado costo y los pacientes que acuden al Instituto son de bajos recursos económicos

Se ha observado que, a consecuencia de las transfusiones sanguíneas, se puede presentar la transmisión de diferentes enfermedades, lo cual en la actualidad y a pesar de todas las medidas presentes usadas, sigue representando un grave problema de salud pública, el que a su vez se agudiza cuando estas transfusiones se suministran a pacientes hemofílicos quienes, por la característica innata de su enfermedad, están expuestos a transfusiones múltiples lo que hace a este grupo de pacientes de alto riesgo y susceptibles de adquirir múltiples infecciones postransfusionales, entre las que sobresalen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) y otros. Por esta razón, antes de transfundir los componentes sanguíneos, se deben someter a un estudio previo de pruebas serológicas como lo indica la norma oficial mexicana que rige a los Bancos de Sangre del país, publicada en el Diario Oficial, el 22 de Mayo de 1986. Una vez que todos estos estudios ya establecidos se confirmen como negativos, podrán ser utilizados todos los componentes sanguíneos (13,14 27,33)

Con todos estos cuidados es posible que la población expuesta a transfusiones y sobre todo el grupo de pacientes hemofílicos no tengan complicaciones postransfusionales, ya que es bien sabido que el tratamiento que se les proporciona es a base de plasma fresco y/o crioprecipitados obtenidos de plasma fresco (13,14,39), lo cual aumenta la incidencia de transmisión de VIH objeto de este trabajo.

OBJETIVOS.

- Determinar la incidencia postransfusional de VIH en la población hemofílica del INP, en quienes el tratamiento terapéutico, ha sido únicamente con derivados sanguíneos obtenidos de donadores familiares
- Con base en los resultados obtenidos saber si los componentes sanguíneos que se administran a los pacientes hemofílicos son seguros para seguir usándolos como tratamiento alternativo en el INP

HIPÓTESIS.

La incidencia de VIH es baja o nula en pacientes hemofílicos politransfundidos en el INP, exclusivamente con componentes sanguíneos procedentes de donadores familiares

CAPITULO I

RETROVIRUS

1.- Características generales del retrovirus.

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es una enfermedad viral ocasionada por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) el cual afecta al sistema inmune incapacitando al individuo para defenderse de toda clase de infecciones y neoplasias ocasionando la muerte

En la actualidad la propagación de la enfermedad por los diferentes mecanismos de transmisión ha creado una pandemia a nivel mundial

Se tiene evidencia de que esta enfermedad se detectó en el año de 1979 probablemente en Estados Unidos, Haití y en África por una serie de casos de pacientes homosexuales, que atravesaron por cuadros de inmunosupresión y en el que probablemente desarrollaron enfermedades oportunistas como son neumonía por Pneumocystis carinii, meningitis criptocócica, tuberculosis, candidiasis, herpes simple y el cáncer típico expresado en pacientes con SIDA que es el Sarcoma de Kaposi, entre otras enfermedades

En el año de 1981, por primera vez se declara el Sarcoma de Kaposi al igual que otras enfermedades oportunistas, en poblaciones estadounidenses como grupos de alto riesgo que presentaron cuadros clínicos de inmunosupresión, es así como en este año se investiga a fondo a esta población por el Dr. James W. Curran y colaboradores (5,12,18)

Por otro lado, en el Instituto Pasteur de Francia y en el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta en Estados Unidos en este mismo año se investiga al agente causal de la enfermedad identificando a un virus asociado a las Linfadenopatías que se relacionaba con la pérdida de la respuesta inmune celular al que se lo denominó Virus de la Linfadenopatía (LAV) por atacar ganglios linfáticos, esta observación fue hecha en Francia mientras que en Estados Unidos lo llamaron Virus - III Linfotrópico de las Células T Humanas (HTLV - III) o retrovirus asociado a inmunodeficiencias (20,23)

En el período de 1982 a 1983, los Drs Luc Montagnier en el Instituto Pasteur de Francia y Robert C Gallo en Estados Unidos desarrollaron sus trabajos para dar a conocer al agente causal de estos cuadros de inmunosupresión reportados en este mismo período, se relacionó el contagio del virus con la transfusión sanguínea y el uso de drogas intravenosas e infecciones congénitas iniciando esfuerzos educacionales para la población de alto riesgo, sobre todo en comunidades de homosexuales (3,4,19)

En el año de 1983 fue declarado el SIDA como una enfermedad ocasionada por el VIH, permitiendo así la homogeneización de criterios para identificar la enfermedad en el Centro de Control de Enfermedades y en la Organización Mundial de la Salud, ya que se reportaron los diferentes casos en comunidades de homosexuales y bisexuales en Estados Unidos y Francia.

El contagio por transfusión sanguínea y de hemoderivados se asoció a los diferentes estudios realizados en pacientes hemofílicos y en aquellos que presentaron deterioro inmunológico por infecciones oportunistas y que previamente habían recibido terapia transfusional (12.19)

En 1984 se llega a la conclusión en Francia y Estados Unidos, que el agente causante de la reducción de los Linfocitos T cooperadores está directamente asociado al mecanismo infeccioso del VIH, la clave importante en esta invasividad es la membrana celular de los linfocitos T que presentan los receptores CD-4 (17).

En el mismo año realizan estudios en África los Drs Max Essex y Phillis J. Kanki, su objetivo fue saber el posible origen del VIH en comunidades africanas de alto riesgo, encontrando que no es exclusivo del humano, ya que también lo reportaron en cierta raza de simios nombrándolo como Virus de la Inmunodeficiencia en Simios (SIV) ó Virus Linfotrópico T en Simios (STLV-IV).

Encontraron que el VIH-2 lo adquieren cierta raza de monos denominada Mono Verde Africano (Cercopithecus aethiops), mostrando así que los humanos y los monos presentan la infección, con la diferencia que los monos no padecen el SIDA como los seres humanos, permaneciendo como reservorios dentro del ciclo de vida del virus, lo que hace imposible que estos animales sirvan como modelo experimental para el estudio del virus, además, no se tiene evidencia de los mecanismos de transmisión de la infección entre humanos y simios (36).

En marzo de 1985 se desarrolla en Estados Unidos la prueba de diagnóstico de Inmunoensayo Enzimático (ELISA) que tiene como objetivo la identificación cuantitativa indirecta de los anticuerpos del VIH, originándose así el empleo de esta prueba de diagnóstico para los donadores de sangre. En este mismo año se aísla el VIH en neuronas cerebrales y líquido cefalorraquídeo, observándose la invasividad del mismo en los diferentes fluidos corporales y otros tejidos, es así como se relaciona al virus con diferentes cuadros neurológicos importantes (24,38)

Posteriormente, la Organización Mundial de la Salud (OMS), inicia diferentes campañas educativas y de información para la prevención del SIDA a nivel mundial

En cuanto a tratamiento, se inician los primeros estudios de pruebas clínicas y terapéuticas contra el VIH en Estados Unidos y Francia

De 1986 a la fecha se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico como son el Western Blot, la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Cultivo celular para determinar directamente la presencia del Virus

En México, en el año de 1986, el Gobierno Federal con ayuda del Sector Salud y del Sector Privado, organizaron y promovieron las campañas de prevención y atención a la población afectada por el VIH, creando así en el año de 1987 una Institución destinada a orientar a individuos infectados, su nombre es CONASIDA, su función es proporcionar servicios de

orientación médica, psicológica, epidemiológica y de difusión, para evitar la diseminación de la infección por el VIH

Los métodos terapéuticos todavía no presentan perspectivas que solucionen el problema ya que sólo se han logrado obtener medicamentos que prolongan la vida del paciente mejorando así su calidad de vida, aunque estos tratamientos tienen la desventaja de los efectos colaterales que dificultan su restablecimiento

Se ha identificado un nuevo problema, en investigaciones con individuos inmunosuprimidos que presentaron el Complejo Relacionado con SIDA (CRS) y SIDA. Esta enfermedad aún se desconoce, pero se le está asignando el nombre de SIDA sin virus debido a que no se han identificado los agentes causales, no se cuenta aún con la información y evidencia epidemiológica necesarias que confirmen la presencia de una nueva cepa del VIH, probablemente mutado, o bien que se trate de las cepas ya identificadas del VIH-1 y VIH-2, sin embargo, se espera que en un futuro se tenga información sobre este nuevo problema que afecta a la población (21)

En el empleo de la inmunoterapia todavía no existe una vacuna efectiva para el VIH, debido a la capacidad de variabilidad genética del virus, no obstante se tiene la esperanza del desarrollo de una serie de vacunas que sean efectivas para dar una opción al control y erradicación del SIDA.

2.- Clasificación del VIH.

El VIH pertenece a la familia Retroviridae subfamilia Lentiviridae, retrovirus que forman un eslabon entre los ARN- viral y ADN-viral

La organización taxonómica del virus codifica al HTLV III como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) para así homogeneizar criterios en su identificación a nivel mundial y diferenciarlo de los otros retrovirus que ocasionan leucemias e inmunosupresión en humanos y animales (37)

Anteriormente a este agente causal lo conocieron como LAV Luc Montagnier y colaboradores en el Instituto Pasteur de Francia en 1983 En 1983 como HTLV-III por Robert Gallo y colaboradores en el Instituto Nacional de Cáncer de los EUA por Jay Levy y cols de la Escuela de Medicina de la Universidad de San Francisco en 1984 (8)

La familia de los retrovirus (Retroviridae) se clasifica de acuerdo a su patogenia y se subdivide en tres grupos que son

(Oncoviridae). Oncovirus, por sus efectos cancerígenos en células

(Lentiviridae) Lentivirus, por sus efectos de enfermedades lentas y progresivas.

(Spumaviridae) Espumavirus, por sus efectos de burbuja en células infectadas

El VIH se encuentra clasificado dentro del grupo de los lentivirus y a su vez se subdivide en VIH-1 y VIH-2, la diferencia de ambas especies radica en el tipo de proteínas contenidas en su estructura viral, ya que el primero contiene las proteínas virales p7, p9, p17, p24, Gp41, Gp120, comparado con el segundo que presenta las proteínas virales p13, p25, Gp36, Gp130

Estas características le confieren diversidad genética en su estructura y en sus pesos moleculares sin embargo, ambos virus presentan la misma agresividad infectiva sobre los marcadores CD-4 en células blanco de los linfocitos OKT-4+ humanos

La variabilidad en proteínas de ambos virus no modifica sus funciones o su mecanismo de duplicación, sólo su estructura química y su peso molecular

3.- Morfología del VIH.

Los retrovirus presentan la característica de contener dentro de su estructura viral la ADN polimerasa (Retrotranscriptasa) enzima capaz de transcribir el ADN celular codificándolo a ADN proviral como mecanismo de duplicación

Las características morfológicas de interés del VIH como retrovirus, es que poseen envoltura viral cuyos genomas contienen copias duplicadas de ARN de cadena sencilla de alto peso molecular de la misma polaridad que el ARN mensajero viral, capaces de codificar

el ADN celular transcribiéndolo por retrotranscripción como mecanismo para su duplicación, presenta una estructura icosaédrica en su parte exterior

Se ha descrito que contiene una bicapa lipídica que dá protección al virus, así como el core y su respectivo ADN viral

En la membrana del virus se observa que la envoltura externa presenta estructuras como espículas que rodean al núcleo y constituyen la nucleocápside misma que contiene el material genético del virus (ADN viral), (10.21) ver figura No 1

En cuanto a la expresión del genoma del VIH se encuentran proteínas glicosiladas y proteínas simples de pesos moleculares variables

Figura No.1

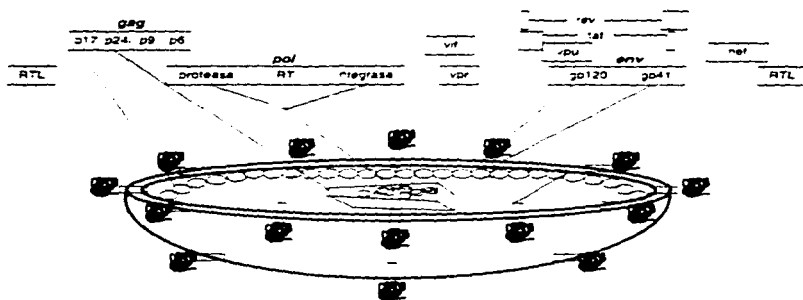


FIGURA 1. Organización del genoma del VIH-1. En la parte superior se muestran los diferentes marcos de lectura y las proteínas originadas por cada uno de los genes del virus. En la parte inferior está un esquema de la estructura del virion, señalando con flechas la localización de las diferentes proteínas estructurales.

Explicación de la Figura No.1

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

GENES	PROTEÍNAS (Prot)	CARACTERÍSTICAS O FUNCIONES
gag	p55 Prot. precursora de	Antígenos de grupo internos
	p17	Proteína mixoblada de la matriz.
	p24	Proteína de la cápside.
	p15 Prot. precursora de:	Proteínas de la nucleocápside.
	p7	Prot. unida al ácido nucleico.
pol	p6	Nucleocápside
	p90 Prot. precursora de:	Enzimas
	p10	Proteasa
	p13	RNasa H.
	p66,p55	Transcriptasa reversa.
env	p34	Integrasa
	p180 Prot. precursora de:	Proteínas de la envoltura
	gp120	Proteína de envoltura, superficie (VIH-1)
	gp41	Proteína de envoltura, transmembrana (VIH-1)
	p300 Prot. precursora de:	Proteínas de la envoltura.
	gp125	Proteínas de envoltura, transmembrana (VIH-2).
	gp36	Proteínas de envoltura, transmembrana (VIH-2).

PROTEÍNAS REGULADORAS

GENES	PROTEÍNAS	CARACTERÍSTICAS Y/O FUNCIONES
tat	p14	Transactivador de todas las proteínas
rev(art.trn)	p19	Regulador de la expresión de las proteínas virales. (Rotura y transporte de ARNm precursor). Transporte selectivo de ARNm en el citoplasma
nef(3'orf)	p27	Desconocida No ejerce acción sobre el crecimiento viral en el mantenimiento del estado de latencia.
vif(sor)	p23	Proteína asociada a la infectividad del virión, se necesita para la infectividad de los viriones extracelulares.

rap(vpr)	p15	Situada entre vif y tat. Acelerador del ciclo de replicación. Aumenta la tasa de producción de proteínas.
vpt	p17(Tev o Trv)	Desconocida. La proteína se codifica por fragmentos de tres genes diferentes: tat, env y rev.
out(vpu)	p16	Sólo en VIH-1. Aumenta la liberación de viriones de la célula infectada, reduciendo la acumulación de proteínas virales. Reduce la formación de sincicios y la muerte celular de células T - humanas CD4+. Podría aumentar el título de virus presente en la persona infectada.
vpx	p16	Proteína de 113 aa, solo en VIH-2 y VIS.

En cuanto a la estructura del core (GAG) o proteínas internas, contendrán las proteínas virales: p55, p17, p15, p9 y p7. Existen proteínas precursoras de p55 y son: p53, p33, p25, p18, p13 y p6 localizadas en el núcleo del virus.

En la estructura de la polimerasa (POL) estarán las proteínas p16 (proteasas virales), p66 y p51 (proteínas de la retrotranscriptasa), y p34 correspondiente a la endonucleasa, existen las proteínas precursoras p150 y p160.

El Lector de Armazón Corto Abierto (SOR), contiene las proteínas p23 las proteínas de la envoltura (ENV) que contienen las glicoproteínas, Gp160, Gp130, Gp120, Gp41, Gp36, con la proteína precursora Gp110 correspondiente a las proteínas transmembranales.

Dentro de la misma estructura estará el Activador Transcripcional-Translacional (TAT) que contendrá la glicoproteína Gp17 cuya función es esencial en la multiplicación del virus en células y junto con el gen ART que contienen las proteínas p16 y p14 que regulan la expresión de las proteínas virales.

El Lector de Armazón Largo Abierto 3'-orf (LOR) contiene la proteína p27.

La nomenclatura que se asignó a cada proteína fue de acuerdo a su peso molecular en miles y se nombró como proteína (p) indicando que se trata de una estructura no glicosilada y las proteínas (Gp) por ser glicosiladas, su número también está en relación a su peso molecular.

En estudios realizados por el Dr. Robert Gallo se identificó la presencia de las proteínas p25 y p24.

La diferencia entre el VIH-1 y VIH-2 radica en las proteínas contenidas en su estructura viral, ya que el VIH-1 contiene las proteínas virales, p7, p9, p17, p24, Gp41 y Gp120. Comparando con el VIH-2 que presenta las proteínas p13, p25, Gp36, Gp1 (28). Figuras 2-A, 2-B

Estas características le confieren diversidad en estructura y peso molecular a las dos especies de virus, sin embargo, ambas especies presentan la misma agresividad infectiva sobre los linfocitos OKT-4+ humanos, la variabilidad en proteínas no modifica las funciones del virus, sólo su estructura química.

4.- Propiedades Físico-Químicas del VIH.

Los retrovirus tienen funcionalmente la cápside viral, la cual le sirve de protección al ácido nucleico viral de la degradación enzimática del hospedero, esta cápside está rodeada por una envoltura viral la cual está constituida por una cadena de polipéptidos y se inactiva por congelación y descongelación y por agentes químicos solventes de lípidos y detergentes.

El virus es lábil al calor, pero su infectividad puede ser preservada a temperaturas bajas de -70°C y se puede destruir su infectividad por la acción de solventes de lípidos, y por agentes que dañen su ácido nucleico.

Figura No. 2-A

Estructura del virus VIH-1

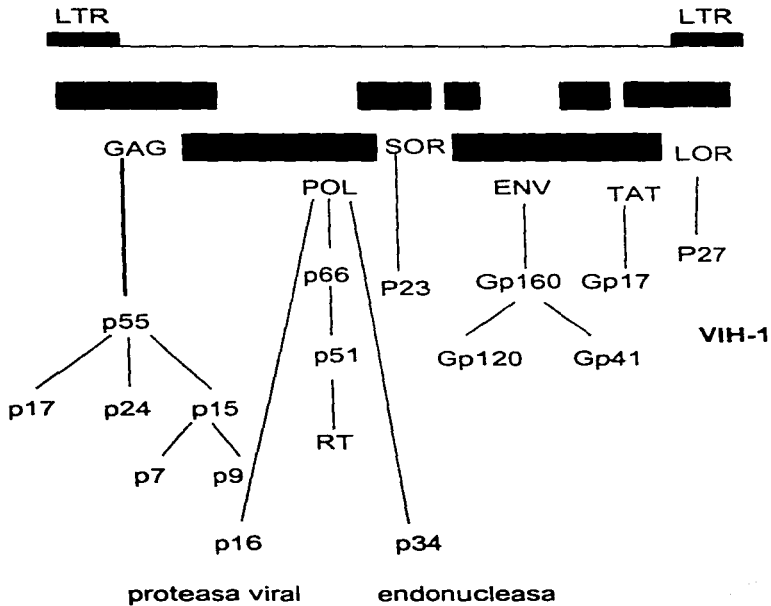
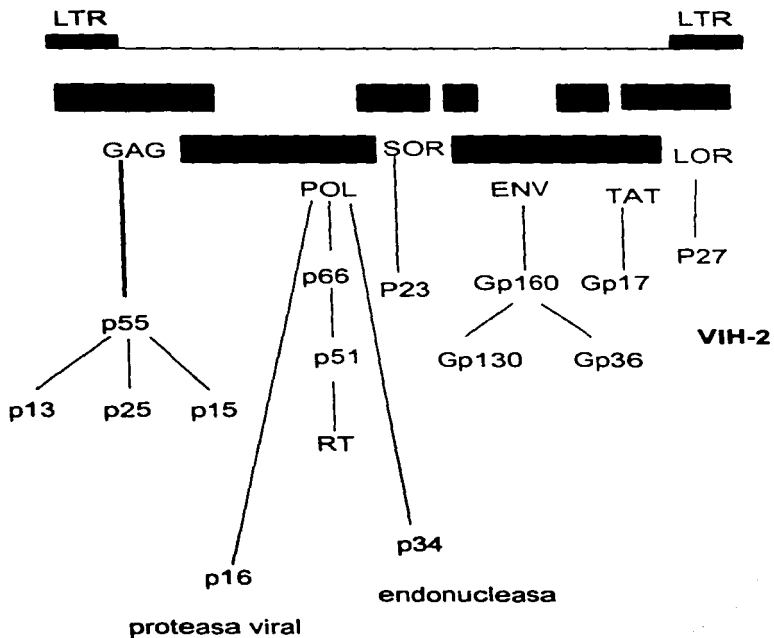


Figura No. 2-B

Estructura del virus VIH-2



Los agentes físicos, químicos y biológicos que actúan sobre la infectividad del virus son

Físicos: calor, ultrasonificación y radiación

Químicos: fármacos como son zidovudina (AZT), que actúa inhibiendo la síntesis de ADN y sobre la retrotranscriptasa reversa, solventes - detergentes

Didesoxinocina (DDI), que presenta actividad in vitro frente al VIH tanto en células T como en los macrófagos

Didesoxicidina (DDC) que actúa también sobre ADN.

Biológicos: enzimas e inhibidores de proteasas

5.- Patogenia y Patología.

5.1.- Características de la interacción virus-hospedero.

El VIH se replica e infecta a los linfocitos CD-4 preferentemente, pero también infecta a los macrófagos, lo cual hace posible la detección en cualquier fluido o tejido corporal que contenga estas células. El VIH se ha aislado de la sangre, componentes de la sangre, semen, secreciones genitales femeninas, leche materna, líquido cefalorraquídeo, saliva, lágrimas, etc. Hay gran cantidad de estudios que indican que la saliva, las lágrimas y la orina aunque contengan virus, usualmente no transmiten la enfermedad.

La transmisión tras la exposición a fluidos o secreciones infectadas depende de:

- Cantidad de virus infeccioso presente y del espécimen infectado.

- Vía de transmisión
- Condiciones inmunológicas de la persona infectada.
- Cepa viral

La transmisibilidad aumenta en los estadios más avanzados de la infección, así como cuando ya hay enfermedad clínica. También se ha asociado una mayor transmisibilidad con enfermedades genitales ulceradas.

La susceptibilidad parece ser universal. Se desconoce qué factores del hospedero influyen para que la infección por el VIH no ocurra siempre tras una o varias exposiciones. De cualquier forma, la posibilidad de transmisión depende de la prevalencia de la infección y de los factores de conducta.

Se calcula que entre un 10% a 20% de las personas infectadas evolucionarán a SIDA dentro de los 5 años después de la seroconversión y alrededor de un 50% entre los 7 a 10 años.

El período de incubación es variable, siendo éste el tiempo que pasa desde la infección por VIH hasta el diagnóstico de la enfermedad. Varía entre dos meses y 10 años (1).

5.2.-Interacción virus-célula.

Forma secuencial de los eventos que se presentan en la interacción virus-célula

Reconocimiento.

El virus reconoce a la molécula CD-4 a través de la glicoproteína 110/120

Adherencia.

El virus se adhiere a la membrana de la célula en una unión de tipo receptor-ligando

Entrada.

Una vez adherido, el virus penetra por un mecanismo de endocitosis mediado por receptores del interior de la célula hospedera.

Activación de la enzima transcriptasa reversa

La enzima se activa y transcribe la información de su ARN en ADN de doble cadena.

Integración del ADN viral.

El ADN se integra al genoma de la célula hospedera quedando entonces como provirus, éste puede permanecer latente por mucho tiempo

Transcripción y traducción del ADN viral. El ADN viral es transcrito por la maquinaria celular formando ARN mensajero viral, éste, mediante complejos mecanismos de regulación, es procesado por la traducción y síntesis de proteínas virales o para los nuevos viriones.

Ensamblaje.

Las proteínas y el ARN viral se ensamblan utilizando la parte interna de la membrana celular

Salida.

La salida de nuevos viriones ocurre por gemación. la membrana celular envuelve a las proteínas y al ARN viral quedando libres los viriones en el exterior de la célula. La estructura de la cápside extraordinariamente rica en transcriptasa reversa e integrasa, probablemente la haga más resistente a la inactivación, si esto fuera cierto, dicha estructura podría jugar un papel importante en la transmisión de la enfermedad (7)

La infección de las células del Sistema Fagocítico Mononuclear probablemente explica la localización del virus en el recto, vagina, orofaringe y también podría ser la vía de entrada al Sistema Nervioso Central (SNC)

Se sabe que el producto del gen "tat" es indispensable para la replicación viral aún cuando el ARN correspondiente se encuentre presente, pudiera ser que este gen juegue un papel importante en cuanto a la latencia de la infección. Lo que se ha pensado es que las células T-cooperadoras en reposo (no estimuladas por un antígeno) pero infectadas con el virus, inhiban la función del gen "tat", así, al ponerse en contacto estos linfocitos con su antígeno cesaría la inhibición, disparándose la replicación viral (8,21). Figura 3.

INTERACCIÓN ENTRE EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA Y LAS CÉLULAS DEL HUMANO

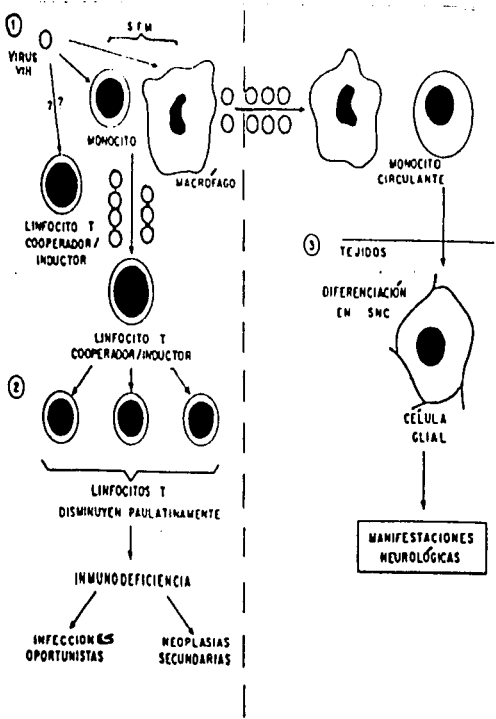


Figura No. 3

5.3.- Cuadro clínico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA).

Desde la aparición del SIDA en México, el Sistema Nacional de Salud a través de la Dirección General de Epidemiología ha recolectado los datos necesarios para la comprensión de la epidemiología del VIH/SIDA.

El análisis de los datos obtenidos por medio de la vigilancia e investigaciones epidemiológicas, ha permitido conocer la magnitud y frecuencia de la epidemia, caracterizar los factores de riesgo, definir los patrones y tendencias que ha adquirido la transmisión del VIH en relación con grupos poblacionales y áreas geográficas, realizar estadísticas predictivas con respecto al número de casos de personas infectadas, y así poder diseñar estrategias de tipo educativo para ayudar a disminuir el riesgo de infección (7)

El SIDA es causado por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) el cual puede ser transmitido a través de diferentes vías sexual, sanguínea y perinatal ya que se localiza en algunos fluidos corporales como sangre, semen, y secreciones vaginales de las personas infectadas (6)

Las cuatro palabras de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, son descriptivas de la enfermedad que ocasiona

Síndrome.

El SIDA se manifiesta a través de una serie de enfermedades y síntomas diversos que suelen ser fatales.

Inmunodeficiencia:

El virus del SIDA hace que el cuerpo sea incapaz de combatir ciertas infecciones y enfermedades

Adquirida

El virus del SIDA se adquiere de manera externa

El flujo de información genética usualmente se pensaba que era exclusivamente del ADN al ARN y de ahí a la síntesis de una proteína, por invertir este flujo de información este grupo de virus recibe el nombre de RETROVIRUS

Los retrovirus almacenan la información genética en forma de ARN y poseen una enzima la transcriptasa reversa, que les permite sintetizar ADN viral, el cual se integra a los cromosomas de las células (provirus retroviral integrado) para servir en el futuro como base para la replicación viral. La infección por VIH puede cursar asintomática o presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que difiere en niños y adultos (6.24)

5.4.- Clínica de la infección por VIH.

La historia natural de la infección por el VIH se puede dividir en

A.- Fase aguda (varias semanas de evolución)

El paciente infectado permanece asintomático o presenta un síndrome mononucleósico durante la primoinfección (30-40% de los casos), que a menudo pasa inadvertido. Durante este proceso agudo puede haber una inmunodepresión transitoria, capaz de facilitar la aparición de algunas infecciones oportunistas como Candidiasis esofágicas o infección por Citomegalovirus (1).

Dentro de las 2-6 semanas posteriores al contagio, irá apareciendo paulatinamente el antígeno p24 circulante. El cultivo viral será positivo y una elevada proporción de linfocitos CD-4 estarán infectados. Progresivamente se irán sintetizando los anticuerpos específicos y se desarrollará la inmunidad celular, a la vez que la viremia, la antigenemia y las células infectadas irán disminuyendo.

B.- Fase crónica de replicación viral activa (varios años de duración)

Durante esta fase, la cual suele durar varios años, la actividad replicativa viral persiste, aunque está limitada por la actividad del sistema inmunológico.

La probabilidad de que la infección progrese a estadios más avanzados es de un 50% a los 8-10 años de primoinfección en adultos y de un 80% en niños. No parece que existan diferencias significativas en cuanto a la progresión a SIDA de homosexuales y drogadictos.

De todos modos, diversas evidencias sugieren que las personas infectadas por transfusiones evolucionan más rápidamente a SIDA que el resto, quizás se debe a la exposición de un mayor inóculo viral

C - Fase final (crisis)

Clinicamente correspondería al complejo relacionado con el SIDA (CRS) y al SIDA

El incremento de la actividad replicativa del virus coincide clínicamente con la aparición de una severa alteración del estado general (síndrome de desgaste) infecciones oportunistas, neoplasias o alteraciones neurológicas. A partir de este momento se establece el diagnóstico de SIDA.

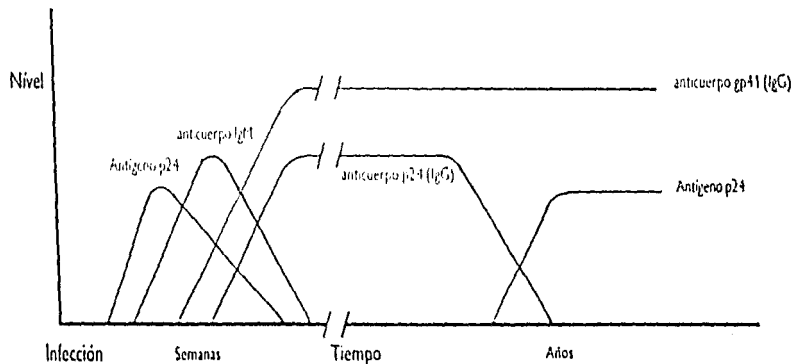
Por ahora, los mejores resultados se han conseguido con el tratamiento con Azidotimidina (AZT) y hablan de una supervivencia del 50-75% a los 2-3 años. El pronóstico mejora si a las 6-12 semanas de haber iniciado la terapia asciende la cifra de los linfocitos CD4 y disminuyen los niveles de beta2-microglobulina sérica (1). Figura 4.

5.5.- Clasificación y estadios de la infección por el VIH.

Para establecer el diagnóstico de SIDA se han diseñado varias clasificaciones clínicas. La más utilizada ha sido la clasificación del Centro de Control de Enfermedades (CDC). En 1990 la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una nueva clasificación que considera, a la vez, las manifestaciones clínicas y parámetros inmunológicos. Aunque esta clasificación no está todavía generalizada probablemente es la más idónea para estudiar la enfermedad (1).

Diagnóstico de laboratorio de la infección por VIH

Marcadores serológicos de la infección por VIH



CLASIFICACIÓN DEL CDC (1).

GRUPO I Infección aguda (hay que demostrar seroconversión).

GRUPO II Infección asintomática.

GRUPO III Adenopatías generalizadas persistentes.

GRUPO IV Otras enfermedades.

SUBGRUPO A Enfermedad constitucional. Fiebre de más de 1 mes junto con pérdida de +10% de diarrea de más de 1 mes.

SUBGRUPO B Trastornos neurológicos, demencia, mielopatía o neuropatía periférica.

SUBGRUPO C Enfermedades infecciosas asociadas al VIH-1

SUBGRUPO D Neoplasias asociadas al VIH, Sarcoma de Kaposi, Linfoma no Hodgkin o primarios de SNC.

SUBGRUPO E Otras enfermedades, deben incluir a los pacientes con clínica relacionada con con el VIH-1 y no incluidos en los subgrupos anteriores.

CLASIFICACIÓN DE LA OMS.

Esta clasificación es la más reciente y tiene la ventaja de combinar parámetros clínicos y biológicos.

ESTADÍO 1

Paciente asintomático. Adenopatías generalizadas persistentes.

Nivel 1 asintomático, actividad normal

ESTADÍO 2

Pérdida de peso de menos del 10% del peso habitual

Manifestaciones cutáneas mínimas (dermatitis seborreica, prurito, onicomycosis, úlceras orales recurrentes)

Herpes Zoster durante los últimos 5 años

Infecciones respiratorias altas recurrentes (ej. sinusitis bacteriana)

y/o Nivel 2: presencia de síntomas, actividad normal

ESTADÍO 3

Pérdida de peso de más del 10% del peso habitual.

Diarrea crónica no explicada de más de 1 mes de evolución.

Fiebre prolongada (constante o intermitente) no explicada de más de 1 mes de evolución.

Candidiasis oral. Leucoplaquia oral vellosa. Tuberculosis pulmonar durante el último año.

Infecciones bacterianas severas (ej. neumonía)

y/o Nivel 3: paciente encamado menos del 50% del tiempo el último mes.

ESTADÍO 4

Síndrome de desgaste según la definición del CDC

Neumonía por *P. carinii*. Toxoplasmosis cerebral. Criptosporidiosis con diarrea de más de 1 mes. Criptococosis extrapulmonar. Enfermedad por CMV con afectación de otros órganos aparte del hígado, bazo y ganglios linfáticos.

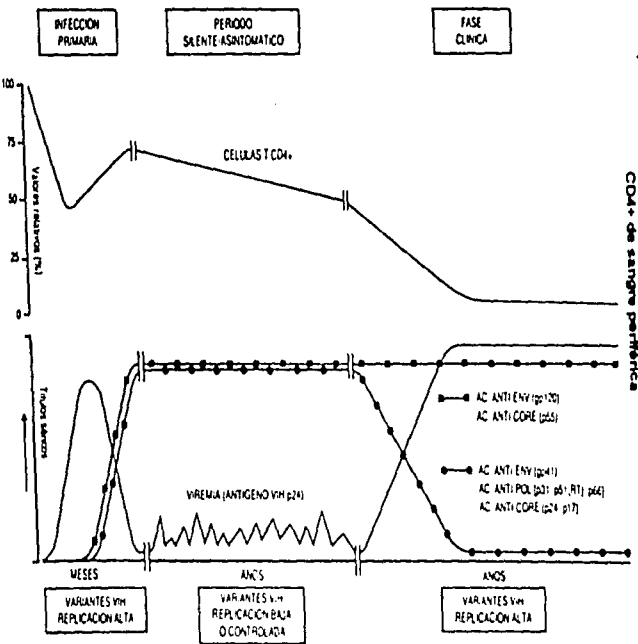
Infección por el virus del Herpes simple mucocutáneo de más de 1 mes de duración o visceral de cualquier duración. Leucoencefalopatía multifocal progresiva.

Cualquier micosis endémica diseminada (ej. histoplasmosis, coccidioidomicosis).

Candidiasis esofágica, traqueal, bronquial o pulmonar. Infección diseminada por micobacterias atípicas. Sepsis por *Salmonella sp* diferente de *S. typhi*. Tuberculosis extrapulmonar. Linfoma. Sarcoma de Kaposi.

y/o Nivel 4: paciente encamado más de 50% del tiempo el último mes (1). Figura 5

Patrones de evolución, a lo largo de la infección VIH, de la antigenemia p24, de los anticuerpos frente a diferentes proteínas de VIH y de la citras de células T CD4+ de sangre periférica



PRINCIPALES AGENTES INFECCIOSOS EN PACIENTES CON SIDA

VIRUS

Herpes tipo 1 y 2

Varicela Zoster

Adenovirus de Epstein Barr

Retrovirus (HTLV-I y II)

Poxvirus del Molusco Contagioso

MICOBACTERIAS

Especies de Legionella

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium kansasii

Mycobacterium avium-intracellulare

BACTERIAS

Campylobacter jejuni

Neisseria gonorrhoeae

Shigella sp.

Salmonella typhimurium

Chlamydia trachomatis

PROTOZOARIOS

Pneumocystis carinii

Toxoplasma gondii

Isospora belli

Cryptosporidium parvum

Entamoeba histolytica

HONGOS

Candida albicans

Nocardia sp.

Aspergillus fumigatus

ESPIROQUETAS

Treponema pallidum

5.6.- Marcadores biológicos de progresión a SIDA.

El porcentaje o el número reducido de células CD4+ circulantes y, de modo menos específico la linfopenia, constituyen probablemente los parámetros de mayor valor predictivo

Estos marcadores reflejan de forma directa o indirecta la acción que ejerce el VIH sobre el sistema inmunológico del paciente y se han utilizado independientemente o combinados. Así la progresión a SIDA a los 3 años, se produce en el 99% de los casos si la beta2-microglobulina es mayor de 5 mg/L, el antígeno p24 es positivo y los linfocitos CD4 son inferiores a 200 células/mm³ (1)

5.7.- SIDA pediátrico

Las principales vías de contagio son los hemoderivados y la vía materno-fetal. La infección durante el parto es posible, pero no parece muy frecuente. No hay datos que sugieran la indicación de cesárea como medida preventiva. La tasa de transmisión de la infección vía vertical se estima en un 15-20%. El deterioro del estadio clínico y un número bajo de linfocitos CD4 de la madre, condicionan un mayor riesgo de contagio. Por otro lado, la presencia de anticuerpos frente a la gp120 en la madre se ha asociado con un menor índice de transmisión.

También existe la posibilidad de contagio a través de la leche materna. No existen pruebas de que contactos casuales o incluso el contacto habitual intrafamiliar sean vías de transmisión de la infección. Tampoco tienen riesgo de contagio los compañeros de colegio de los niños infectados (1).

Definición del CDC de la infección por VIH en niños.

Los niños menores de 18 meses con infección perinatal, deben presentar:

- VIH en sangre o tejidos, o
- Síntomas que cumplan la definición de caso de SIDA para el CDC, o
- Anticuerpos anti- VIH y signos de la inmunodeficiencia humana celular y síntomas.

Los niños con infección perinatal de más edad o los que han adquirido la infección a través de otra vía de transmisión deben presentar (1)

- VIH en sangre o
- Anticuerpos anti-VIH con o sin alteraciones inmunológicas, o
- Síntomas que cumplan la definición del CDC de caso SIDA.

Manifestaciones

No se conoce con exactitud el periodo de incubación, aunque se sabe que es más corto en niños infectados por vía vertical y más corto en niños que en adultos. Las manifestaciones inespecíficas se definen como 2 de los siguientes hallazgos persistentes durante al menos 2 meses: fiebre, retraso de la estatura y peso o pérdida de peso de más del 10% de éste, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía generalizada, infiltración parotídea y diarrea persistente o recurrente (1).

6.- Inmunidad.

6.1.- Aspectos inmunológicos

La infección por VIH afecta preferentemente a los linfocitos T cooperadores del sistema inmunológico, las anomalías inmunológicas halladas en esta etapa infectiva del virus son las inmunodeficiencias celulares severas y profundas que presentan hipersensibilidad retardada, linfadenopatía absoluta causada por el déficit de los linfocitos OKT-4+ con inversión de la relación usual entre las células T cooperadoras y las células T supresoras (OKT-8+) por lo cual, se observa una depresión en los linfocitos frente a factores mitogénicos y alteraciones en las células NK, no se ha detectado que la respuesta humoral y la fijación de complemento se vean afectados, sólo se ve reducido el número de células con marcadores CD-4, aunque esta enfermedad al igual que otras, induce la hipergammaglobulinemia, observándose altos títulos de anticuerpos algunos investigadores reportan que la estructura y composición del timo se alteran, ya que se reduce notablemente la cantidad de timocitos hasta dejarlo en cifras nulas. Bajo esta situación, es importante señalar los trabajos del Dr. Thomas y colaboradores, en los que se demostró que, al disminuir el funcionamiento del timo aumenta el número de neoplasias, señalando a la respuesta linfocítica como la responsable del control de las neoplasias y que, al presentar inmunodeficiencias, no se tendría control en el desarrollo de las mismas. Es de suma importancia relacionar a estos padecimientos con algunos factores como la edad.

La diferencia que presenta el virus del VIH, comparándolo con otros virus, es la de ocasionar un desgaste en la respuesta del timo o en la respuesta celular, Linfadenopatías inducidas por inmunosupresión y el aumento progresivo de neoplasias. El VIH-1 reflejará anomalías cualitativas e inmunológicas y cuantitativas como leucopenias, déficit y disfunción de los marcadores CD-4+ de los linfocitos T cooperadores, activación policlonal de células B con deterioro de la respuesta de las mismas frente a nuevos antígenos dando lugar al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), que se caracteriza por infecciones oportunistas y un progresivo aumento en el número de neoplasias.

Otras alteraciones inmunológicas que se manifiestan durante la infección son (10-11)

- a) Presencia de complejos inmunológicos y/o alteraciones del factor supresor sérico
- b) Disminución de precursores linfoides
- c) Respuesta defectuosa de anticuerpos por infecciones bacterianas de repetición, con interferón sérico disminuido
- d) Aumento de infecciones virales, aumento de tumores secundarios e inmunosupresión.
- e) Involución y destrucción epitelial del timo.
- f) Inhibición de la respuesta mitogénica y el factor de necrosis tumoral aumentado.

g) Interferón lábil frente a ácidos muy incrementados

h) Los marcadores biológicos que varían antecediendo las manifestaciones del SIDA son: Interleucina-1 disminuida con beta-2 microglobulina incrementada

i) Anemia.

En cuanto a la producción de inmunoglobulinas en el período de seroconversión se encuentra un alto título de IgM como respuesta inicial al período de infección que es aproximadamente al 5o mes del contacto con el virus este tiempo varía de acuerdo a diferentes factores físicos y ambientales, cuando el individuo llega a desarrollar el SIDA los títulos de anticuerpos de tipo IgG presentan un aumento progresivo

7.- Epidemiología del VIH.

Desde el inicio de la pandemia de VIH/SIDA a principios de la década de los ochenta, se identificaron tres vías de transmisión del virus responsable de esta enfermedad la sexual, la sanguínea y la perinatal. La sanguínea incluye a su vez, la infección asociada a la transfusión de sangre contaminada y la administración de derivados de sangre contaminada, cuando en el proceso industrial de los mismos no se siguen procedimientos que garanticen la eliminación de agentes virales.

La transmisión de la infección por VIH a través de transfusiones contaminadas es la más eficiente; se estima que la probabilidad de que una persona se contamine es superior al 95% (35).

En el caso de los pacientes hemofílicos, los productos que se asociaron a un mayor riesgo de infección por VIH al inicio de la epidemia fueron los concentrados de factores de coagulación (Factores VIII y IX)

A nivel mundial, se estima que entre el 3-5% de las infecciones por VIH se asocian a transfusiones de sangre o sus derivados, sin embargo, existen variaciones importantes entre países y regiones

En los países de Europa Occidental, la proporción de casos de SIDA asociados a transfusión sanguínea en adultos varió comparativamente con los Estados Unidos como sigue:

	1985	1990
Europa Occidental	7%	5%
Estados Unidos	3%	3%

Relación con respecto a sexo

	1985		1990	
	H	M	H	M
Europa Occidental	6%	19%	4%	10%
Estados Unidos	2%	12%	2%	4%

Esta diferencia entre los sexos se presenta prácticamente en todo el mundo y se explica sobre todo por la mayor frecuencia con que las mujeres reciben transfusiones durante la edad reproductiva (35)

Los pacientes hemofílicos fueron de los grupos más afectados, particularmente en los países industrializados. Según estimaciones del CDC de Atlanta, hasta Enero de 1992 en Estados Unidos se había presentado un total de 1 876 casos de SIDA en hemofílicos y cerca de 1,200 habían muerto. Se estima que cerca del 50% de los pacientes con trastornos hereditarios de la coagulación se han infectado con el VIH.

Diversos estudios a nivel mundial sobre la prevalencia de VIH en pacientes hemofílicos, revelan que son mayores las cifras en aquellos países donde se utilizan concentrados de factores de coagulación preparados a partir de mezclas (pool) de plasma, que entre los hemofílicos de países en los cuales funcionan programas de donadores voluntarios, los cuales

presentan menor prevalencia de infección. En general, la incidencia de SIDA en estos pacientes hemofílicos aumentó 10 veces de 1984 a 1990 (35)

Incidencia de VIH en pacientes hemofílicos en varios países: (2)

País	Reporte hasta 1993
Yugoslavia	50%
Italia (Génova, Padua)	22%
Italia (Catania, Trento)	28.1%
EEUU	25.1%
Suecia	15%
EEUU (New York)	50%
Israel	30.9%
México (CMN Siglo XXI)	53%

En 1985 se notificaron los primeros dos casos de SIDA asociados a transfusión sanguínea, que fueron en mujeres adultas. Hasta el 1 de Julio de 1994 se había acumulado en México un total de 19,090 casos de SIDA registrados, de los cuales 18,539 son adultos y 551 pediátricos (35)

El 12.3% de los adultos (1,728) se han asociado a transfusiones, 2.3% (318) son exdonadores remunerados y 1% (147) son pacientes hemofílicos. De los casos pediátricos, 25% (116) corresponden a niños transfundidos y 17.3% (80) a hemofílicos.

Desde el inicio de la epidemia de SIDA en México y hasta Julio de 1994 se habían reportado un total de 227 casos de SIDA en pacientes hemofílicos sin ningún otro factor de riesgo 147 (65%) eran adultos y 80 (35%) menores de 15 años. No se han reportado casos de SIDA en hemofílicos menores de un año.

El número de casos de SIDA en pacientes hemofílicos creció en forma constante desde 1987

1987	24 casos
1991	53 "
1992	27 "
1993	31 "
JULIO 1994	6 "

El mayor avance en la prevención de la transmisión del VIH/SIDA en México se ha logrado a través del tamizaje de donadores de sangre, la autoexclusión de donadores con prácticas de riesgo y la prohibición del comercio de sangre (35).

8.- Diagnóstico.

La especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo se ha empleado para el desarrollo de diferentes procesos que reciben el nombre de "INMUNOENSAYOS".

En estos procesos se utilizan antígenos, haptenos o anticuerpos para la identificación o cuantificación de moléculas de interés en el laboratorio clínico.

El análisis inmunoenzimático se fundamenta en la propiedad de las enzimas de ser conjugadas o unidas a anticuerpos o antígenos en forma covalente, sin que el conjugado resultante (Ag-enzima, Ac-enzima) pierda sus características de reactividad inmunológica o enzimática. La característica de las enzimas para catalizar la conversión de un gran número de moléculas de sustrato, proporciona la base para amplificar y detectar indirectamente una reacción Ag-Ac. Así mismo, en casi todos estos sistemas la acción de la enzima sobre los sustratos genera productos coloridos, lo que permite la realización de pruebas cualitativas interpretadas visualmente por los cambios en el color y de pruebas cuantitativas utilizando un colorímetro o espectrofotómetro midiendo la intensidad del color desarrollado (22)

La infección por el VIH puede ser identificada en el laboratorio de diferentes formas

Métodos Indirectos

- Determinación de anticuerpos anti-VIH.
- Determinación de antígenos virales.

Métodos Directos

- Cultivo de virus.
- Identificación del ADN viral mediante técnicas como la PCR.

Actualmente se cuenta con un gran número de pruebas para la detección de anticuerpos anti-VIH tales como: Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), inmunoelectrotransferencia (WESTERN BLOT), aglutinación y radioinmunoprecipitación (RIPA). De éstas, la aglutinación, el ELISA y el WESTERN BLOT son las pruebas más utilizadas (11)

8.1.- Aglutinación.

Esta técnica se basa en que partículas sensibilizadas con VIH inactivado son aglutinadas por la presencia de anticuerpos contra el VIH presentes en muestras de suero o plasma. Este tipo de prueba tiene la ventaja de que se realiza en poco tiempo, no es muy costosa y no requiere equipo sofisticado. Como desventaja, se reporta la subjetividad en su interpretación.

8.2.- ELISA

La prueba de ELISA para detectar anticuerpos anti-VIH es el método más usado para determinar la infección por VIH en adultos y en niños de más de 15 meses de edad, reportándose una sensibilidad y especificidad en la mayoría de los ensayos de por lo menos 99.5% y 99.85% respectivamente. Esta técnica comúnmente detecta la presencia de anticuerpos de tipo IgG por lo que en los casos de niños menores de 15 meses de edad, nacidos de madres seropositivas, se puede utilizar una modificación de esta prueba para detectar anticuerpos de tipo IgM e IgA en el suero del niño ya que éstos no atraviesan la placenta y su presencia indica una respuesta inmune específica a la infección.

La mayoría de estos tipos de ELISA consisten en una fase sólida la cual contiene un antígeno viral, a la cual se le agrega la muestra a analizar (suero o plasma). Posteriormente se agrega una inmunoglobulina anti-IgG humana conjugada con una enzima y finalmente se adiciona un cromógeno el cual va a producir una reacción colorida si es que se encuentran presentes anticuerpos anti-VIH en el suero del paciente.

ELISA de primera generación.

Emplean en su fase sólida antígenos de lisado viral, lo que las hace poco específicas y muy sensibles. La baja especificidad presentada se puede atribuir a la falta de pureza de los antígenos utilizados

ELISA de segunda generación

Emplean en su fase sólida péptidos sintéticos y/o antígenos recombinantes obtenidos por Ingeniería Genética, estos antígenos son muy específicos pero tienen la característica de ser poco sensibles, esto nos indica que se pueden obtener resultados falsos negativos lo que es muy grave en una prueba de tamizaje

ELISA de tercera generación

Emplean en su fase sólida antígenos recombinantes glicosilados Péptidos sintéticos modificados químicamente con el fin de optimizar la configuración espacial de la molécula, el conjugado es una mezcla de anti-IgG más anti-IgM lo que le confiere un efecto de sinergismo en el medio de reacción dando una mayor sensibilidad y una mayor especificidad al reactivo (31).

Algunas de las ventajas de estas pruebas de ELISA son que los resultados pueden cuantificarse espectrofotométricamente, que son fáciles de realizar y que los reactivos son relativamente baratos y estables

Las pruebas de Aglutinación y ELISA se emplean como pruebas de tamizaje, tanto para garantizar la seguridad de productos sanguíneos y tejidos humanos de donadores, como para realizar el diagnóstico presuntivo de individuos con riesgo de infección

8.3.- WESTERN BLOT

El Western Blot sigue siendo la alternativa más específica para el diagnóstico serológico confirmatorio del VIH, también se utiliza para monitorear el desarrollo de anticuerpos específicos a un tiempo dado de la infección al igual que en el ensayo de ELISA

El principio de esta técnica se basa en incubar el suero o plasma del paciente con tiras de nitrocelulosa que contengan proteínas virales, los anticuerpos específicos contra cada una de estas proteínas, si existen, se unen a los antígenos correspondientes, se añade un cromógeno que tiñe las tiras en bandas que corresponden a la distribución de los antígenos virales en las tiras de nitrocelulosa (31)

9.- Tratamiento.

Con respecto a los tratamientos terapéuticos, no existen perspectivas que solucionen el problema, ya que sólo se han logrado obtener medicamentos que prolonguen la vida del paciente, dentro de éstos que se tienen como una alternativa está

Azidotimidina (AZT), Rivavirina (Aciclovir), Fosfonoformato (PFA), Dideoxinosina (D D I), Zidobudina (D D L), Timodina (T I B O R83150), Suramina, AS-101 e Interferón Gamma entre otros (6.9)

Todos los medicamentos antes señalados tienen diferentes mecanismos de acción y variados efectos terapéuticos, lo mismo que ciertos inconvenientes lo que hace imposible su total efectividad

El tratamiento con los diferentes fármacos antes señalados presentan muchas limitantes, una de ellas es su alto costo, lo que hace imposible el acceso a estos

Otra limitante, es que algunos medicamentos no se encuentran en el mercado nacional y, por consiguiente, no se tienen de forma inmediata.

Otra limitante es que el paciente con tratamiento tiene que estar en seguimiento con respecto a su respuesta inmunológica y los estudios de laboratorio para este fin son también de alto costo.

CAPITULO II

HEMOFILIA

1.- Características generales de la hemofilia.

1.1.- Generalidades.

La hemofilia se puede definir como una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X, que se produce por la deficiencia del Factor VIII o del Factor IX de la coagulación y se caracteriza por sangrados de intensidad variable, de acuerdo al nivel circulante del factor deficiente

Frecuentemente se clasifica como severa, moderada y leve, de acuerdo a la concentración plasmática del factor deficiente

Severa: Tienen menos del 1% de actividad (-1 unidad de factor/dL) y frecuentemente tienen hemorragias en articulaciones y músculos al mínimo traumatismo.

Moderada: Tienen entre 1 y 4% de actividad y presentan hemorragias con traumatismos de intensidad moderada

Leve: Tienen entre 5 y 30% de actividad del factor y presentan hemorragias con traumatismos intensos o intervenciones quirúrgicas (14,39).

1.2.- Datos históricos.

La hemofilia apareció con la presencia del hombre sobre la faz de la tierra. Las primeras descripciones acerca de la enfermedad se remontan al Talmud donde se exceptuaba de la circuncisión ritual a aquel niño cuyos hermanos hubieran sangrado excesivamente después de realizar este procedimiento.

Posteriormente se registraron evidencias de la enfermedad en la familia real de Inglaterra y en el siglo XIX se registró su diseminación en la realeza europea. Quizá el caso histórico más conocido es el del Duque Alexis, hemofílico, hijo del Zar Nicolás II y de la Zarina Alexandra de Rusia.

Nasse en 1820, reconocía un patrón bien definido de la enfermedad. Biggs y Mc Farlane en esa misma época, atribuyen la forma de herencia a la enfermedad. Hopff en 1824 otorga el nombre de hemofilia, del griego hemos= sangre y filia= amor es decir amante de la sangre. En 1839, John Otto publicó la primera descripción de la hemofilia y en 1893 Wright demostró la prolongación de los tiempos de coagulación en estos pacientes. En 1937 Peket y Taylor aislaron la proteína deficiente, una globulina a la que denominaron globulina antihemofílica. La división de la hemofilia en dos entidades diferentes, deficiencia del factor VIII y del factor IX, la sugirieron en Argentina Castex y cols y Pavlovsky, posteriormente fue confirmada por muchos otros grupos.

2.- Cuadro clínico.

Clinicamente estas enfermedades no pueden ser diferenciadas. El diagnóstico de pacientes hemofílicos se basa en criterios clínicos y de dosificación de la actividad coagulante de los factores VIII y IX, este último permite clasificar a la enfermedad como severa, moderada o leve.

El síntoma por excelencia de la hemofilia es la hemorragia y la variada sintomatología del paciente hemofílico es, sino en toda, en su mayor parte debida a las secuelas y complicaciones del síndrome hemorrágico.

Los sangrados musculoesqueléticos son en general el principal problema de los pacientes hemofílicos severos. La sintomatología en los niños puede iniciar cuando comienzan la deambulación y la frecuencia de los traumatismos aumentan notablemente.

3.- Incidencia.

Es un padecimiento con distribución mundial que afecta primordialmente al varón, con una incidencia en Inglaterra de 3-4 casos y en EUA hasta de 10 casos por cada 100,000 habitantes.

Se ha estimado que existen 20,000 hemofílicos en EUA, de los cuales el 80% tienen hemofilia A y un 20% hemofilia B. M. Pavlovsky en Argentina, reporta 1 caso por cada 22,700 habitantes y en México se ha estimado 1 caso por cada 77,000 habitantes, sin embargo, probablemente esta incidencia sea mayor debido a que existen casos no diagnosticados (25).

La proporción de pacientes con deficiencia de factor VIII, en relación a los deficientes de factor IX es de 5.25 a 1 en Inglaterra, proporcionalmente muy semejante a lo encontrado por Dorantes y cols en México de 4.9 a 1 y similar a la encontrada en Costa Rica (32)

4.- Herencia.

Se hereda en forma recesiva ligada al sexo, sin embargo, en aproximadamente 30% de los casos no existe ningún antecedente familiar, por lo que hablaríamos de una "mutación de novo". De acuerdo a su forma de herencia se puede concluir que

- 1.- Todas las hijas de un hemofílico son portadoras obligadas
- 2.- Todos los hijos de un hemofílico son normales
- 3.- Aproximadamente la mitad de las hermanas de un hemofílico son portadoras.
- 4.- Aproximadamente la mitad de los hijos de una portadora serán hemofílicos.
- 5.- Aproximadamente la mitad de las hijas de una portadora serán portadoras.

6.- Tratamiento.

El tratamiento de la hemofilia ha tenido un notable progreso desde la obtención de los crioprecipitados obtenidos a través del plasma fresco obtenido de donadores familiares, esto permitió tener un avance en el tratamiento de los pacientes hemofílicos para controlar las hemorragias evitando las complicaciones mortales. Posteriormente, el fraccionamiento industrial del plasma por parte de algunas compañías farmacéuticas permitió obtener los concentrados liofilizados de factores VIII y IX, procedentes de la mezcla de varios miles de donadores con un uso ampliamente difundido en los países industrializados por la facilidad de su manejo y almacenamiento. Este tratamiento permitió al hemofílico mayor libertad al poder utilizarlo oportunamente en casa.

6.1.- Terapia sustitutiva.

El tratamiento sustitutivo está basado en la aplicación del factor deficiente (VIII o IX), el cual se obtiene a partir del fraccionamiento de la sangre total de donadores que acuden al banco de sangre del INP.

La sangre se fracciona en concentrado eritrocitario y plasma fresco que contiene todos los factores de la coagulación y este, a su vez, se fracciona en crioprecipitado que contiene aproximadamente 70 a 80 unidades de factor VIII en cada bolsa con la ventaja de poco volumen en la infusión, sin embargo tiene la desventaja del riesgo de contaminación viral inherente a los componentes derivados de la sangre que no se someten a la inactivación viral.

7.- Contaminación viral.

La transmisión del VIH en la década pasada, con la transfusión de factores VIII o IX , ensombreció el tratamiento de los pacientes, sin embargo, la experiencia positiva permitió mejorar la calidad de los concentrados tratados con solventes-detergentes y calentamiento para evitar la contaminación viral

No se puede dejar de mencionar que, aún con los estudios que se le realizan al donador, no es factible hablar de un 100% de seguridad en la transfusión sanguínea, puesto que existen periodos de ventana en los cuales no se detectan algunos virus que pueden ser causa de contaminación como son El virus de la Hepatitis C, el virus de la Hepatitis B, Citomegalovirus, muy recientemente se habla del Parvovirus B19 y por supuesto del VIH (25)

8.- Pronóstico.

El pronóstico de los pacientes con hemofilia ha mejorado notablemente con los logros alcanzados con el tratamiento sustitutivo, así como con la difusión de programas de tratamiento oportuno y de rehabilitación temprana; sin embargo, a pesar de estos logros, existen algunos hemofílicos que no tienen acceso a estos servicios , por lo tanto su pronóstico no es tan halagador como para otro grupo de hemofílicos más privilegiados

El pronóstico depende de la severidad de la enfermedad y de la disponibilidad de servicios adecuados para la población de hemofílicos.

CAPITULO III

DONADORES

1.- Definición de un donador.

La norma técnica que rige a todos los bancos de sangre ha dado un nuevo nombre a las personas que se designaban como donadores y es el de donante de sangre. Se define como aquel sujeto que proporciona su sangre o componentes sanguíneos para quien lo requiera (34)

Un donante de sangre, es un individuo sano que por voluntad propia, se apeg a las normas legales que regulan la donación de órganos y se somete a las pruebas clínicas y de laboratorio a fin de contribuir al tratamiento terapéutico de un paciente, por lo que expresa por escrito dicha voluntad

2.- Requisitos para ser donador.

- Estar en ayuno
- Tener una edad entre 18 y 65 años.
- Pesar más de 50 Kgs
- Someterse a los exámenes clínicos y de laboratorio para descartar enfermedades transmisibles.

Se pueden excluir donadores en los siguientes casos (34).

- Haber padecido hepatitis, sífilis, cáncer, diabetes, epilepsia, hipertensión arterial, gota, tuberculosis, enfermedades renales, y/o problemas cardiacos
- Tener alergia a alimentos o medicamentos
- Haber tenido cirugía mayor en los últimos seis meses.
- Estar embarazada o haberlo estado en los últimos seis meses.
- Estar en periodo menstrual.
- Estar en periodo de lactancia

Así como en el caso de haber recibido

- Medicamentos en las últimas 72 horas.
- Vacunas contra la rabia o contra la hepatitis en el último año.
- Vacunas en los últimos 3 meses.
- Tatuaje o acupuntura en el último año

3.- Legislación de la donación:

Con el fin de limitar y controlar la propagación de la infección con el virus de la Inmunodeficiencia Humana, en nuestro país se han adoptado las siguientes medidas preventivas y legales (27,33)

1 - En mayo de 1986, se establece la obligatoriedad de las pruebas para detectar la infección por VIH en donadores

2.- Desde noviembre de 1986, el SIDA y la infección por VIH son sometidos a vigilancia epidemiológica

3.- En mayo de 1987, se prohíbe la comercialización de la sangre y en su lugar, en el segundo semestre de 1987, inicia sus actividades la RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE DETECCIÓN DE VIH

La adopción de dichas medidas ha implicado modificaciones a la Ley General de Salud y la creación de reglamentos y normas específicas, que den forma e integren la fundamentación legal de estas acciones (27)

A cada uno de los donadores de sangre se le debe realizar

1.- Exámen médico previo a la donación con el fin de detectar algún antecedente personal de importancia y valorar su estado de salud

2.- La sangre se debe someter a la prueba de tamizaje, que puede ser por hemaglutinación o por ensayo inmunoenzimático.

3.- Si la prueba de tamizaje es negativa la sangre puede ser conservada y procesada.

4.- Si por el contrario la prueba de tamizaje es positiva, la sangre se desecha y se realiza una segunda prueba de tamizaje.

5 - El resultado positivo de una segunda prueba de tamizaje hace necesario realizar una prueba confirmatoria. En México se utiliza la de Electroinmunotransferencia

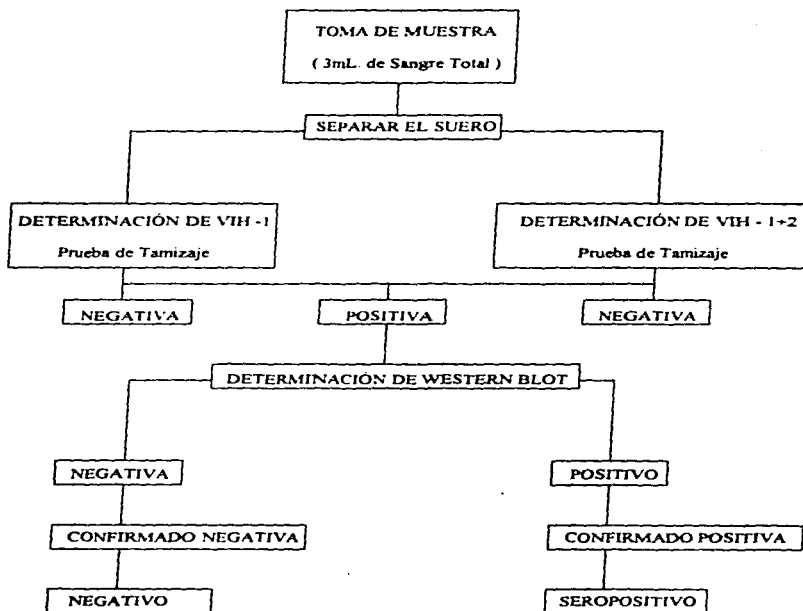
6 - Si el resultado de esta prueba es negativa, el donador puede estar libre de infección o bien presenta una situación indeterminada, en este caso se requiere evaluar si es necesario su seguimiento

Además del seguimiento indicado por la ley General de Salud, todos los bancos de sangre desde 1986, han tenido siempre una norma técnica editada por el Diario Oficial, con sus modificaciones correspondientes, de acuerdo a la aparición de nuevas infecciones que pueden ser transmitidas transfusionalmente (27).

CAPITULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

1.- DIAGRAMA DE FLUJO:



2.- Material

2.1.- Material biológico

- Suero de 70 pacientes hemofílicos atendidos y transfundidos en el INP, con un promedio de edad de 9 años 6 meses

2.2.- MATERIAL DE LABORATORIO.

- Gasa.
- Gradilla metálica de 6x15 cm.
- Guantes desechables
- Papel absorbente
- Pipeta semiautomática de 10-100, 50-200, 100-1000 μ L
- Pipeta de vidrio graduada de, 1mL, 5mL, 10mL.
- Probeta de vidrio de 100mL, 1000mL
- Puntas desechables de plástico para pipeta semiautomática.
- Recipiente para desechos biológicos
- Recipiente para material de vidrio
- Reloj de intervalos con alarma
- Tubo de vidrio de 12x75mm.

2.3.- Reactivos de laboratorio.

- Agua desionizada
- Hipoclorito de Sodio (NaClO) 1 10

2.4.- Reactivos de diagnóstico.

Pruebas de ELISA (tamizaje)

RAPID - ELAVIA

Detección de Anticuerpos Anti-VIH-1

Sanofi Diagnostics Pasteur

GENELAVIA MIXT

Detección de Anticuerpos Anti VIH-1 y VIH-2

Sanofi Diagnostics Pasteur

Prueba de WESTERN BLOT (confirmatoria)

NEW LAV-BLOT-1

Detección de Anticuerpos Humanos Anti VIH-1

Sanofi Diagnostics Pasteur

2.5.- Equipo de laboratorio.

- Centrifuga clinica

- Lavador de placa

LP - 35 Sanofi Diagnostics Pasteur

- Incubador de placas

I.P.S Sanofi Diagnostics Pasteur.

-Lector de placas

LP - 400 Sanofi Diagnostics Pasteur

-Lavador y Agitador para tiras de WESTERN BLOT

LS - 12 Sanofi Diagnostics Pasteur

3.- Metodología

3.1.-Recolección y manejo de la muestra .

La sangre se recolecta de acuerdo a las reglas clásicas de venopunción. Puede utilizarse en la prueba suero o plasma. En este caso se utilizó suero

Remover el suero del material coagulado tan rápido como sea posible, para evitar hemólisis, ya que puede afectar el ensayo

Las muestras con fibrina deben clarificarse por centrifugación previa a la prueba

Se tomaron 3 mL de sangre total a cada uno de los pacientes hemofílicos que entraron en este estudio. El total de pacientes estudiados fue de 70 de éstos, 52 pacientes tenían diagnóstico de Hemofilia A y 18 pacientes diagnóstico de Hemofilia B.

La edad de los pacientes estaba entre 1 a 21 años 4 meses con una media de edad de 9 años 6 meses. Todos con más de dos transfusiones.

3.2.- Parámetros y desarrollo del estudio.

Este trabajo se realizó durante los meses de Agosto y Septiembre de 1993, 1994, 1995 y 1996 con la determinación del VIH a cada uno de los pacientes en estudio mediante dos técnicas de ELISA diferentes.

A los sueros que dieron reacción positiva se les realizó la determinación de la prueba confirmatoria para el VIH.

3.3.- RAPID - ELAVIA (29).

Fundamento

Es un ensayo inmunoenzimático indirecto (EIA) para la detección de anticuerpos VIH -1 humanos en suero o plasma. Se basa en el uso de un soporte de fase sólida (recubierto con antígeno viral purificado e inactivado), y anticuerpos anti IgG humana de cabra, purificados por cromatografía de afinidad y marcados con peroxidasa.

El procedimiento de la técnica comprende los siguientes pasos:

1 - Se pipetea 100 μ L de las muestras y los sueros control diluidos en los pozos sensibilizados de una microplaca. Si los anticuerpos anti VIH-1 están presentes, éstos se ligan a los antígenos virales fijados a la fase sólida.

2 - Los pozos se lavan. Se adiciona anti IgG humana marcada con peroxidasa, que se une a la IgG retenida en la fase sólida.

3.- La presencia de la enzima inmovilizada en los complejos se revela por incubación en presencia de un sustrato, previa eliminación del conjugado libre.

4.- La reacción se detiene y se lee la absorbancia (A), en un espectrofotómetro a 492/620 nm.

La comparación de la medida de absorbancia de cada muestra con el valor de corte, permite concluir acerca de la presencia o ausencia del anticuerpo VIH-1.

Componentes del equipo:

- R-1 Microplaca (en tiras) 6x16 pozos cubiertos de Antígeno VIH.
 - R-2 Solución de lavado concentrado 10 veces
 - R-3 Suero control negativo humano.
 - R-4 Suero control positivo humano
 - R-5 Suero límite (humano)
 - R-6 Conjugado (Anticuerpos de cabra anti IgG humana acoplado con peroxidasa) concentrado 10 veces.
 - R-7 Diluyente para muestras, concentrado 2 veces
 - R-8 Solución del sustrato de peroxidasa (0.03% H₂O₂) en amortiguador
 - R-9 Cromógeno orto-feniléndiamina (2HCL)
 - R-10 Solución de paro (ácido sulfúrico).
 - R-11 Diluyente del conjugado
- Etiquetas para microplaca.

Trabajos previos a la prueba.

Todos los reactivos se deben llevar previamente a temperatura ambiente.

Solución de lavado: diluir 1:10 con agua destilada. Preparar 500 mL por placa de 6 tiras.

Conjugado: Adicionar 1 volumen de conjugado concentrado a 9 volúmenes de diluyente de conjugado. Preparar 12 mL de solución final para una microplaca completa o 2 mL por tira.

Diluyente de muestra: Adicionar 1 volumen de agua destilada a un volumen de diluyente de muestra, listo para usar.

Cromógeno: Disolver 1 tableta de OPD en 10 mL de amortiguador R-8

Procedimiento

Utilizar el control negativo control positivo y el suero límite, en cada serie de determinaciones para validar los resultados

- 1.- Establecer cuidadosamente la distribución e identificación de las muestras
 - 2.- Preparar la solución de lavado diluida
 - 3.- Preparar la solución diluyente de muestras
 - 4.- Diluir los controles, el suero límite y las muestras de los pacientes 1:50 en solución diluyente.
 - 5.- Tomar el número necesario de tiras. Llenar cada pozo con solución de lavado, esperar 2 minutos, aspirar y lavar una segunda vez. Vaciar y secar la placa por inversión o con papel absorbente
 - 6.- Adicionar a los pozos
- A1,B1: 100 μ L de control negativo diluido
- C1,D1,E1,F1: 100 μ L de suero límite diluido.
- G1,H1: 100 μ L de control positivo diluido.
- A2,B2,C2, etc.:** 100 μ L de muestras diluidas desconocidas S1,S2,S3,etc.
- Cubrir con una etiqueta de placa, presionar firmemente.**

- 7.- Incubar la microplaca 30 min a 40 °C.
- 8.- Preparar la solución de conjugado necesaria 10 min antes.
- 9.- Retirar la etiqueta . Aspirar el contenido de todos los pozos y adicionar 0.30 mL de solución de lavado a cada pozo, aspirar.
- Repetir el lavado 2 veces, secar la placa y colocarla sobre papel absorbente.
- 10.- Distribuir 100 µL de la solución de conjugado reconstituida en todos los pozos. Cubrir la placa con una etiqueta e incubar 30 min a 40°C
- 11 - Retirar la etiqueta. Lavar 4 veces como se realizó anteriormente. Secar volteando la placa sobre papel absorbente
- 12.- Preparar la solución sustrato justo antes de su uso
- 13 - Distribuir rápidamente 100 µL de solución de sustrato a cada pozo, evitando la luz directa. Incubar 30 min a temperatura ambiente (18-25°C) en la oscuridad
- 14.- Transcurrido el tiempo de incubación adicionar 50 µL de solución de paro, con la misma secuencia de distribución y tiempo.
- 15.- Leer la absorbancia de cada pozo a 492/620 nm en un lector de placas antes de 30 min de haber adicionado la solución de paro. Resguardar la placa de la luz directa antes de leer.
- 16.- Verificar los resultados por identificación de las muestras.

Cálculo e interpretación de los resultados.

La presencia o ausencia de anticuerpos VIH se determina por comparación de la absorbancia de la muestra con el valor del suero límite.

1.- Determinación del valor límite (Valor de corte)

$$\text{Valor de corte (VC)} = (C1+D1+E1+F1+)/4$$

donde C1,D1,E1,F1 = suero límite o suero débil positivo.

Este valor promedio de absorbancia es el valor de corte

Si uno de los valores del suero débil positivo está fuera de rango eliminarlo para la determinación del VC, pero si dos o más de éstos salen de rango la técnica se invalida.

2.- Cálculo de la absorbancia media de

- Suero control negativo (R3)
- Suero control positivo (R4)

Validación del ensayo

Para que el ensayo sea válido:

- La absorbancia media del control positivo debe ser mayor de 0.8.
Absorbancia R3 < Valor de corte > absorbancia R4
- De no cumplirse lo anterior, rechazar el ensayo.

Interpretación de resultados.

Abreviaturas

VC = Valor de corte

Abs = Absorbancia

Las muestras con Abs menor al VC, se consideran no reactivas y pueden considerarse negativas para anticuerpos VIH-1.

Las muestras menores cercanas al VC deben ser interpretadas cautelosamente y correrse nuevamente la prueba por duplicado

Las muestras con Absorbancia igual o mayor al VC se consideran inicialmente reactivas y deben ser probados por duplicado antes de su interpretación

Si después de la prueba las absorbancias son menores de VC, los resultados originales se pueden considerar no reproducibles y por lo tanto negativos

Si después de repetir el ensayo, la absorbancia de una de las 2 muestras es igual o mayor al VC, la muestra debe considerarse reactiva y se consideran positivas para anticuerpos VIH, se recomienda realizar prueba confirmatoria.

3.4.- GENELAVIA MIXT (30).

Fundamento

Se basa en el uso de una fase sólida cubierta con antígenos (proteínas recombinantes gp 160 y péptidos sintéticos similares a los epitopos inmunodominantes de VIH-1 y glicoproteínas de envoltura de VIH-2) y de una peroxidasa unida a un anti IgG y anti- IgM humanos purificada por cromatografía de afinidad

El procedimiento incluye los siguientes pasos en la reacción

1.- Se pipetea las muestras de suero y los sueros control y se colocan dentro de los pozos de la microplaca. Si hay anticuerpos contra VIH-1 o VIH-2 éstos se unen a los antígenos inmovilizados a la fase sólida

2 - Los pozos se lavan, y se adiciona el conjugado de peroxidasa unida a las inmunoglobulinas anti-IgG y anti-IgM. Este reactivo se une a las IgG e IgM capturadas en la fase sólida

3 - La presencia de la enzima inmovilizada sobre los complejos inmunes, se revela durante la incubación en presencia del sustrato, antes de adicionar el sustrato, se remueve el conjugado no unido

4.- La reacción se para y la intensidad del color se mide mediante su absorbancia en un espectrofotómetro a 492/620 nm.

La absorbancia promedio de una muestra nos indica la presencia o ausencia de anticuerpos VIH-1 o VIH-2 a ser determinados

Componentes del equipo

- R1.- 12 tiras de 8 pozos con antígenos purificados de VIH-1 VIH-2.
 - R2.- Solución de lavado concentrada 10x
 - R3 - Suero control negativo humano
 - R4.- Suero umbral humano
 - R5 - Suero control positivo humano
 - R6 - Diluyente de muestras
 - R7.- Conjugado (peroxidasa unida a anti IgG+IgM humanas obtenidas en cabra)
 - R8.- Solución del sustrato de peroxidasa (0.03% H₂O₂) en amortiguador.
 - R9 - Cromógeno (Orto-fenilén-diamina 2 HCL)
 - R10.-Solución de paro (ácido sulfúrico 4N)
- Plásticos adhesivos para microplaca

Trabajos previos a la prueba

- Solución concentrada de lavado Diluir 10 veces la solución de lavado en agua destilada.
- Preparar 500 mL para 12 tiras.
- Cromógeno: Disolver un comprimido de OPD en 10 mL de amortiguador (R8).

Procedimiento

Emplear los sueros control negativo, positivo y umbral, en cada una de las corridas para validar el ensayo.

- 1 - Establecer el plan de distribución e identificación de las muestra
- 2 - Preparar la solución diluida de lavado
- 3 - Sacar de la bolsa protectora las tiras de reacción necesarias y colocarlas en el soporte de microplacas
- 4 - Depositar directamente, sin prelavar la placa, sucesivamente
 - 80 μ L de diluyente en cada pozo a utilizar
 - 20 μ L de suero control negativo (R3) en el pozo A1
 - 20 μ L de suero control umbral (R4) en los pozos B1,C1,D1
 - 20 μ L de suero control positivo (R5) en el pozo E1
 - 20 μ L de la primera muestra en el pozo F1
 - 20 μ L de la segunda muestra en el pozo G1,... etc

Homogeneizar la mezcla con tres aspiraciones como mínimo.

- 5 - Cubrir con papel adhesivo firmemente la superficie total de las tiras.
- 6 - Incubar la microplaca 30 min a 40°C
- 7.- Retirar el papel adhesivo. Aspirar completamente el contenido de los pozos y añadir a los pozos 0.3 mL de solución de lavado. Aspirar de nuevo. Repetir el lavado 2 veces más (3 lavados en total). Voltar la microplaca sobre papel absorbente y golpear contra él varias veces.

- 8.- Colocar 100 μ L de solución de conjugado a cada uno de los pozos agítandolo previamente. Cubrir nuevamente los pozos con papel adhesivo e incubar 30 min a 40°C
- 9.- Retirar el papel adhesivo y realizar 4 lavados siguiendo el procedimiento de lavado del punto 7. Secar la placa
- 10 - Preparar el sustrato justo antes de su empleo. Esta solución no debe estar a la luz por más de 10 min
- 11 - Distribuir rápidamente evitando la luz directa, 100 μ L de sustrato en cada uno de los pozos. Incubar 30 min a temperatura ambiente (18-25°C), en la oscuridad
- 12 - Después de transcurrido el tiempo de incubación, adicionar 50 μ L de solución de paro, siguiendo la misma secuencia y tiempo de la distribución del cromógeno
- 13 - Leer las densidades ópticas de la microplaca a 492/620 nm empleando un lector de microplacas dentro de los 30 min posteriores al paro de la reacción (la microplaca deber permanecer en la oscuridad antes de leerse)

Cálculo e interpretación de los resultados

La presencia o ausencia de anticuerpos contra el VIH-1 y/o VIH-2 se determina comparando la absorbancia promedio para cada muestra con el valor de corte calculado

- 1.- Calcular el promedio de absorbancia del suero control umbral (DOR4)

$$DOR4 = DO(B1)+DO(C1)+DO(D1)/3$$

2.- Calcular el valor de corte

El valor de corte está dado por la relación

$$\text{Valor de corte} = \text{DOR4}/10 = \text{VC}$$

3.- Validación

- El suero control negativo debe ser menor al 70% del VC
- El promedio del suero control umbral debe ser mayor que 0.6
- La relación $\text{DOR5}/\text{DOR4}$ debe ser mayor o igual a 1.3

4 - Interpretación de los resultados

Las muestras con valores de absorbancias menores al valor de corte se consideran negativas.

Los resultados justo abajo del valor de corte

$$\text{DO VC} < 10\% > \text{DO VC}$$

deben interpretarse con precaución y la muestra debe ser probada por duplicado

Las muestras con valores de absorbancia igual o mayor al valor de corte se consideran inicialmente positivas para la prueba. Estas muestras deben probarse por duplicado antes de la interpretación final. Si después de repetir las muestras, los valores de absorbancia por duplicado son menores que el valor de corte, es decir, que los valores no son reproducibles, la muestra se considera negativa

Si después de correr por duplicado las muestras, la absorbancia es igual o mayor que el valor de corte y es reproducible al resultado inicial, la muestra se considera positiva.

Es necesario que las muestras se confirmen por la técnica de Western Blot.

3.5.- NEW LAV- BLOT (28)

Fundamento

La prueba se basa en el principio de la prueba de ELISA indirecta en un soporte de nitrocelulosa, conteniendo todas las proteínas que constituyen al VIH-1

Son proteínas virales inactivadas de VIH-1 separados de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida en un medio de disociación y reducción, subsecuentemente se transfiere a una hoja de membrana de nitrocelulosa

El procedimiento incluye los siguientes pasos

- 1.- Rehidratar las tiras
- 2.- Incubar los controles y muestras que se van a confirmar. Si los anticuerpos anti-VIH están presentes, estos reconocerán a las proteínas del virus presentes en la tira.
- 3.- Después de lavar, agregar el conjugado anti IgG humana unida a fosfatasa alcalina e incubar.

4 - Después de lavar para remover el exceso de conjugado, agregar la solución reveladora para hacer evidentes las bandas presentes en las tiras de nitrocelulosa

Componentes del equipo

- R1 18 Tiras de nitrocelulosa
- R2 Solución de lavado concentrada 5 veces
- R3 Suero control negativo humano
- R4 Suero control positivo humano
- R5 Conjugado (anti IgG humana obtenida en cabra unida a fosfatasa alcalina)
- R6 Solución reveladora de color 5 bromo-4-cloro-3-indolifosfato(CIP) y nitro azul de tetrazolio (NBT) en amortiguador

Trabajos previos a la técnica

Preparar la solución de lavado en una dilución 1.5 con agua destilada

Procedimiento

- 1.- Transferir a la charola el número de tiras a trabajar identificándolas por numeración continua.
- 2.- Adicionar 2 mL de solución de lavado diluida, a cada tira de nitrocelulosa
- 3.- Incubar durante 5 min con agitación lenta

4.- Adicionar:

20 μ L de control negativo

20 μ L de control positivo

20 μ L de muestra a estudiar, en cada tira en forma progresiva

5 - Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación lenta continua

6 - Drenar el contenido de los canales

7 - Lavar tres veces con 2 mL de solución de lavado diluida, cada lavado se realiza con un tiempo de agitación de 5 min

8 - Drenar toda la solución de lavado. Agregar 2 mL de conjugado e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación lenta

9 - Lavar igual que en los puntos 6 y 7

10 - Agregar 2 mL de solución de revelado en cada una de las tiras. Incubar 5 min a temperatura ambiente en agitación lenta

11 - Lavar tres veces con agua desionizada cada una de las tiras

12 - Secar las tiras en papel absorbente

13.- Interpretar resultados

Interpretación de resultados:

La aparición de bandas de color azul en las tiras problema se compara individualmente con el control positivo para determinar qué bandas aparecen de acuerdo a su peso molecular, éstas se enlistan en la siguiente tabla:

NOMBRE	GENOMA	NATURALEZA	ASPECTO DE LA BANDA
Gp 160	ENV	Glicoproteína. precursora de Gp 110/120 y Gp 41	Banda clara
Gp 110/120	ENV	Glicoproteína de envoltura	Banda con bordes difusos
p 68	POL	Transcriptasa reversa	Banda clara
p 55	GAG	Precursor de proteínas de corazón.	Doble banda
p 52	POL	Proteasa	Banda clara.
Gp 41	ENV	Glicoproteína transmembranal	Banda difusa
p 40	GAG	Precursor de proteína de corazón	Banda clara
p 34	POL	Endonucleasa	Banda clara
p 24/25	GAG	Proteína de corazón.	Banda clara.
p 18	GAG	Proteína de corazón	Algunas veces doble banda

Interpretación : NEW LAV-BLOT I

Es importante el uso del control positivo para la identificación de los anticuerpos revelados:

INTERPRETACIÓN

Positivo

Indeterminado

Negativo

PERFIL

2 ENV + GAG + POL

1 ENV + GAG + POL o

GAG + POL o

GAG o

POL

Ninguna banda o Bandas no clasificadas.

Validación

El control negativo debe aparecer libre de bandas específicas.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- RESULTADOS:

Este trabajo se realizó en el INP con la finalidad de saber si la sangre que se utiliza de banco de sangre es segura para los pacientes politransfundidos, para lo cual se seleccionaron sueros de 70 pacientes hemofílicos en el año de 1993 y se les realizó anualmente dicho estudio durante el periodo de 1993 a 1996, con la finalidad de corroborar que la sangre efectivamente es segura, mediante dos técnicas de ELISA

1 - ELISA RAPID ELAVIA

2 - ELISA GENELAVIA MIXT

Se definió que una muestra sérica era reactiva bajo los siguientes criterios:

- 1.- Valor de la muestra por encima del valor de corte.
- 2.- Valor de la muestra igual al valor de corte.
- 3.-Las muestras menores cercanas del valor de corte (10%) se reevaluaron.

Cuando alguna de las muestras cumplió con cualesquiera de los criterios anteriores se procedió a realizar la técnica de Electroinmunotransferencia (Western Blot) para confirmar el hallazgo.

Es pertinente hacer la aclaración que más del 50 % de los pacientes que ingresaron al estudio tenían transfusiones previas a 1987

En una sola muestra se presentó la reactividad en ambas técnicas de tamizaje

En la tabla No 1 se puede observar la reactividad encontrada en cada una de las técnicas

A esta muestra positiva se le realizó Western Blot obteniendo el siguiente resultado

Tabla No 2

Posteriormente se realiza el seguimiento de los pacientes cada año obteniéndose los siguientes resultados que aparecen en las tablas 3.4 y 5

El paciente que da positiva la prueba de Western Blot, es el mismo por lo cual no se le realiza en forma subsecuente dicha determinación. La edad de este paciente es de 14 años y recibió transfusiones previas al año de 1987.

TABLA No 1

INCIDENCIA EN EL AÑO 1993

PRUEBA	NEGATIVAS		POSITIVAS	
	No	%	No	%
RAPID ELAVIA	69	98.57	1	1.43
GENELAVIA MIXT	69	98.57	1	1.43

TABLA No 2

RESULTADO DE LA PRUEBA CONFIRMATORIA

No de muestras	Interpretación	Perfil
1	POSITIVA	TODAS LAS BANDAS

TABLA No 3

INCIDENCIA EN EL AÑO 1994

TECNICA	NEGATIVOS		POSITIVO	
	No	%	No	%
RAPID ELAVIA	69	98.57	1	1.43
GENELAVIA MIXT	69	98.57	1	1.43

TABLA No 4

INCIDENCIA EN EL AÑO 1995

TECNICA	NEGATIVOS		POSITIVOS	
	No	%	No	%
RAPID ELAVIA	69	98.57	1	1.43
GENELAVIA MIXT	69	98.57	1	1.43

TABLA No 5

INCIDENCIA EN EL AÑO 1996

TECNICA	NEGATIVOS		POSITIVOS	
	No	%	No	%
RAPID ELAVIA	69	98.57	1	1.43
GENELAVIA MIXT	69	98.57	1	1.43

TABLA No 6

Comparacion de incidencia de VIH en pacientes hemofilicos

LUGAR	INCIDENCIA
Yugoslavia	50%
Italia	22%
EEUU	50%
Suecia	15%
Israel	30.9%
México (CMN Siglo XXI)	53%
Mexico (INP)	1.43%

Referencia (35).

2.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede apreciar que no existe diferencia entre las dos técnicas utilizadas, como se muestra en la tabla No 1. Así mismo esto se puede confirmar con la realización del Western Blot (Tabla No 2)

Se puede observar que con pruebas de tamizaje para detectar anticuerpos contra el VIH, se logra determinar con certeza a los positivos verdaderos, en una población de alto riesgo como son los pacientes hemofílicos, además éstas correlacionaron muy bien con respecto a la prueba confirmatoria

Los resultados obtenidos durante el seguimiento anual de los pacientes (1993-1995) nos indican que una buena selección de donadores es importante para evitar infecciones postransfusionales, debido a que estos pacientes fueron transfundidos con componentes sanguíneos obtenidos del banco de sangre del INP

En el presente estudio se obtuvo una incidencia para VIH de 1.43% lo cual demuestra que es muy baja comparada con la reportada en la literatura como se muestra en la tabla No 6

2.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede apreciar que no existe diferencia entre las dos técnicas utilizadas, como se muestra en la tabla No.1 Así mismo esto se puede confirmar con la realización del Western Blot (Tabla No.2).

Se puede observar que con pruebas de tamizaje para detectar anticuerpos contra el VIH, se logra determinar con certeza a los positivos verdaderos, en una población de alto riesgo como son los pacientes hemofílicos; además éstas correlacionaron muy bien con respecto a la prueba confirmatoria

Los resultados obtenidos durante el seguimiento anual de los pacientes (1993-1996), nos indican que una buena selección de donadores es importante para evitar infecciones postransfusionales, debido a que estos pacientes fueron transfundidos con componentes sanguíneos obtenidos del banco de sangre del INP

En el presente estudio se obtuvo una incidencia para VIH de 1.43% lo cual demuestra que es muy baja comparada con la reportada en la literatura como se muestra en la tabla No.6

CONCLUSIONES

- 1.- Se puede considerar la confiabilidad y reproducibilidad de las dos técnicas empleadas (RAPID ELAVIA y GENELAVIA MIXT), así como de la prueba confirmatoria de Western Blot
- 2.- Es importante considerar que más del 50% de la población incluida en este trabajo tenía transfusiones previas a 1987 y se esperaba que la frecuencia de VIH fuera un poco más alta, por lo que se considera un estudio con resultados satisfactorios
- 3.- Se puede sugerir que la terapia transfusional de donación familiar puede seguir siendo la alternativa a pesar de no ser la ideal
- 4.- La terapia sustitutiva en los pacientes hemofílicos sigue siendo el uso de crioconcentrados y el plasma fresco, los cuales tienen la desventaja de un bajo costo y una disponibilidad fácil y rápida, su desventaja es el alto riesgo de la transmisión de infecciones postransfusionales
- 5.- Debido a las condiciones socioeconómicas de los pacientes, no podemos considerar como alternativa el uso de factores VIII y IX liofilizados, debido a su alto costo, aunque pueden reducir las probabilidades de infecciones postransfusionales.

6.- Con los resultados obtenido durante el seguimiento de los pacientes hemofílicos en el período de 1993 a 1996, podemos considerar que efectivamente es segura la sangre que se obtiene en el banco de sangre del INP, debido a que se trabaja bajo los criterios de la norma oficial establecida

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFÍA

- 1 - ABBOT Científica,S A RETROVIRUS División Diagnósticos 1-95/1993
- 2 - Ambriz MD, Bastar ML,Tanner A"Abstracts, XXI International Congress of the World Federation of Hemophilia México, City 1994
- 3 - Amman, A J ,Cowan, M, Wara,D " Acquired inmunodeficiency syndrome (AIDS) "California M M W R 31 652-654 (1982)
- 4 - Amman, A J Cowan,M J, Wara,D " Acquired inmunodeficiency in infant Possible transmission by mean of blood products " Lancet. 1 956-958 (1983)
- 5 - Barr, Sinousi, F, Cherman J C, Rey, F "Isolation of lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired inmunodeficiency syndome (AIDS)" Science 224 500-503 (1984)
- 6 - Bernard Henry John
DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO CLINICO PARA EL LABORATORIO
Masson-Salvat Medicina
9ª Edición
939-942 1290-1292 (1993)
- 7 - Biotech Research Laboratories, INC U S License No 1035 E I Du Pont de Nemour & CO Medical Products Department U S License No 967 1987
- 8 - Boletín mensual SIDA/ETS Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas Año 1 No 7,8,9 (1987)
- 9 - Boletines Mensuales SIDA/ETS Editados por el Intituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas Año 3 No 4,5,7 (1989) Año 5 No 1,3,4,5 (1991) Año 7 No 1 (1993) Año 8 No 7,8,9 (1994).
- 10 - Callahan, K M " Genetic Variability in HIV-1, Gp 160 effects interaction wich HLA molecular and T cell receptor " The Journal Immunology 144 3341-3346 (1990)
- 11.- Constantine N , Callahan J, Watts D HIV Testing & quality control A guide for laboratory personnel Family Health International Durham, North Carolina USA 11-13/21-70/72-73/ 106-115 (1991)
- 12.- Currant, J W, Lawrence, D N, Jaffe, H "Acquired inmunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusions". New England Journal Medicine. 310 69-75 (1984)

13. - Dennis M Smith, Roger Y. Dodd
TRANSFUSION TRANSMITTED INFECTIONS
American Society of Clinical Pathology
Chicago USA, 53-65 (1991)
14. - Ennio C Rossi, Tobit Simon, Moss S Gerald
PRINCIPLES OF TRANSFUSION MEDICINE
2nd Edition
Williams & Wilkins, USA
Baltimore (1991)
15. - Essex Max and Kanki Phyllis " The origins of the AIDS virus" *Journal Scientific American*,
259 44-51 (1988)
16. - Fenner F., White D
VIROLOGIA MEDICA
2a Edición
La Prensa Médica
México, 1981
17. - Feorino, P. M., Jaffe, H. W., Palmer, E. "Transfusion associated acquired immunodeficiency syndrome: evidence for persistent infection in blood donors" *New England Journal Medicine*,
312 1293-1296 (1985)
18. - Friedman K., Kien, A., Laubenstein, L. " Kaposi's sarcoma and pneumocystis among homosexual men New York city and California" *M M W R* 30 305-308 (1981)
19. - Gallo, R. C. and Montagnier, L. "AIDS in 1988" *Journal Scientific American* 259 24-32
(1988)
20. - Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M. "Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS" *Science* 224 500 - 503
(1984).
21. - Haisetine, W. A. and Wong-Staal F. " The molecular biology of AIDS virus" *Journal Scientific American*, 259, 34-35 (1988)
22. - Hunt J, Boardway K, Gutiérrez R, Dawson G "Unique and cross reactive antigenic regions within the transmembrane proteins of HIV-1/HIV-2, and their utility in diagnosis of viral infections". Abstracts Accepted for presentation at the V International Conference on AIDS 3a
1989.
23. - Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M. "Isolation of lymphotropic retrovirus from San Francisco patients with AIDS" *Science* 225 840-842 (1984)

- 24 - Lockwood DYP, Hyman J, Holody T "Comparison of the Organon Teknika corporation HIV antigen assay with six commercially available HIV antigen test kits." V International Conference on AIDS The Scientific and Social Challenge (abstracts) Montreal Quebec Canada 303a. (1989)
- 25 - López N Manual de Hemofilia Servicio de Hematología Instituto Nacional de Pediatría México (1995)
- 26 - Lusher JM Warner I Hemophilia A Hematology/ Oncology Clinics of North America, 6(5) 1021-1034 (1992)
- 27 - Manual de laboratorios de detección de Anticuerpos Anti VIH Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología (1988)
- 28 - Manual de New Lav Blot Sanofi Diagnostics Pasteur (1991)
- 29 - Manual de Rapid Elavia Sanofi Diagnostics Pasteur (1992)
- 30 - Manual de Genelavia Mixt Sanofi Diagnostics Pasteur (1993)
- 31 - Manual para la técnica de ELISA Sanofi Diagnostics Pasteur (1994)
- 32 - Murillo RC, Montero C, Jiménez R
HEMOFILIA, HEMORRAGIA Y TROMBOSIS
Del Grupo CLAHT
Ed IMSS, 1981
- 33 - Norma Técnica No. 324
Para la prevención y control de la infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana.
Secretaría de Salud
Diario Oficial 22 de Mayo de 1986
- 34 - Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993
Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos
Secretaría de Salud
Diario Oficial Julio de 1994
- 35 - Sepúlveda A, Valdespino G Del Rio CH Doce años de SIDA en México S P M Ed. Instituto Nacional de Salud Pública Vol 37 No 6 (1995)
- 36 - Popovic M, Sarngadharan M G, Read E and Gallo R C "Detection isolation and continuous production of cytopathic retrovirus (HLVT-III) from patients with AIDS and pre-AIDS" Science, 224. 497-500 (1984)
- 37.- Privine A., Yakudine A., and Le May M M "Comparative study of virus isolation, polimerasa chain

reaction and antigen detection in children of mother infected with human immunodeficiency virus" J. Pediatrics, 116: 372-376 (1990).

38.- Radfield,R R and Burke,D S "HIV infection: the clinical picture" Journal Scientific American; 259: 70-79 (1988)

39.-Wintrobe Maxwell M
HEMATOLOGIA CLINICA
9ª Edición
Editorial Intermédica,
Buenos Aires Argentina (1994).