

59
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

MODIFICACIONES AL WESTER BLOT PARA
RESOLVER RESULTADOS INDETERMINADOS
EN EL DIAGNOSTICO DEL VIH

TESIS PROFESIONAL

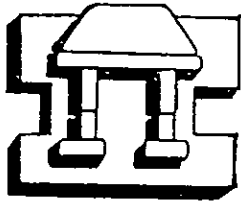
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE ABEL PUENTE SILVA

ASESORA DE TESIS: M. EN C. CARMEN SOLER CLAUDIN



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO DE MEXICO NOVIEMBRE 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

278830



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

DEDICATORIAS

A mis padres: Raquel Silva de Puente y Jose Concepción Puente Villafuerte
por su comprensión y apoyo incondicional en todo momento.

A mis hermanos: Hortencia, Angélica, Milagros, María, Armando, Alberto y Juan,
por su compañía, consejos y gran ayuda durante todo este camino.

A Ramón y Adrián, porque estoy convencido, Dios mediante, que van a superar la difícil prueba que
les toca vivir.

A Rosalba Raquel, porque los momentos de desamor se conviertan poco a poco en amor, que perdure y
sea pleno con el paso del tiempo.

A mis abuelitas, abuelitos, tías, tíos, primas, primos, sobrinas, sobrinos, cuñadas, cuñados, y a mi
familia en general.

A mis primos Toño y Alfredo, porque jamás se doblegaron ante la enfermedad y enseñarnos que, la
posesión más valiosa que podemos llegar a tener en la vida, es la vida misma. Así como, a todas
aquéllas personas que también fallecieron a causa del SIDA.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Carmen Soler, porque me dió la oportunidad de trabajar y convivir con su equipo; por la paciencia que me brindó a manos llenas y por haberme enseñado que el camino de la Ciencia, aunque puede ser largo y sinuoso, es muy agradable cuando se recorre con entusiasmo, curiosidad, y sobre todo, cuando se sabe lo que se esta haciendo.

A todos los integrantes de la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos : Maricarmen, Paty, Amine, Fer, Erika, Eli, Laura, Gaby, Susy, Chivis, Elvia, Luz María, Claudia Gómez, Claudia Wong, José, Raúl, Joel, Memo, Octavio, Ergar, Héctor, y Sergio. A todos, gracias por su amistad y compartirme sus conocimientos.

A Pili, Lulis y Caye, por su amistad y compañerismo.

Al Dr. José Luis Tapia, por su confianza y facilidades otorgadas para la terminación de este trabajo.

A Miguel el de las compu y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron para la realización de este trabajo.

Este trabajo se realizo en los laboratorios de la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos del Instituto de Investigaciones Biomedicas de la Universidad Nacional Autónoma de México ubicados en el Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos, Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades, de la Secretaría de Salud.

INDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCION	2
1.1. PANORAMA HISTORICO	2
1.2. EPIDEMIOLOGIA DEL VIH/SIDA	2
a) Situación Mundial.....	2
b) Situación en México	3
c) Vías de transmisión	4
1.3. EL AGENTE ETIOLOGICO	4
a) Clasificación.....	4
b) Estructura	4
c) Organización genómica.....	5
d) Ciclo de replicación	7
1.4. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION.....	8
1.5. PATOGÉNESIS	9
1.6. PRUEBAS DE DETECCIÓN DEL VIH.....	10
1.7. ANTECEDENTES	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y METODOS	14
3.1. Preparación de antígeno del VIH-1 para Western blot (virus libre).....	14
3.2. Protocolo para geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS).....	16
3.3. Transferencia pasiva de los antígenos separados a un soporte sólido de nitrocelulosa	18
3.4. Bloqueo de las nitrocelulosas	19
3.5. Control de las nitrocelulosas ya transferidas	19
3.6. El material biológico: las muestras de suero	19
3.7. Procedimiento del inmunoblot o Western blot.....	20
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSION	26
6. CONCLUSIONES	28
7. BIBLIOGRAFIA	29

RESUMEN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente etiológico de una de las enfermedades más terribles y devastadoras de nuestro tiempo: el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Millones de personas de todas las edades en el mundo se encuentran infectadas con el VIH, y a nivel nacional, se cuentan en miles las personas portadoras del virus. El diagnóstico de la infección con el VIH está basado en la detección de anticuerpos contra epítopos de proteínas virales en ensayos de tamizaje y en la prueba con la que generalmente es confirmada la infección con el virus: el Western blot (WB), que aunque proporciona resultados negativos y positivos, también otorga resultados indeterminados o inconclusos que provocan confusión y ansiedad a médicos y pacientes. Nosotros en este trabajo implementamos modificaciones al Western blot convencional para conservar parcialmente la estructura nativa de algunas proteínas virales, evitando su desnaturalización total, con lo que logramos resolver el diagnóstico entre un 37 a un 71%, según el criterio de interpretación empleado (FDA y OMS) en 260 muestras de sueros con resultados indeterminados. Estos datos se obtuvieron efectuando la corrida simultánea de este WB modificado y el WB tradicional empleando en ambos casos las mismas muestras de suero. Comparando los resultados del WB regular con los del WB modificado encontramos un aumento en la sensibilidad en particular si consideramos la detección de las glicoproteínas gp120 y gp41. Otra observación importante es el hecho de que las bandas de p51 observadas en muestras indeterminadas en el Western blot regular que podríamos considerar como falsas positivas disminuyen en 45%, mas sin embargo, la detección de anticuerpos contra proteínas consideradas claves para el diagnóstico no se alteran. Sugerimos la aplicación de esas sencillas modificaciones en el WB tradicional para obtener un mejor diagnóstico confirmatorio de la infección con el VIH.

1. INTRODUCCION

1.1 PANORAMA HISTORICO

Entre octubre de 1980 y mayo de 1981, un grupo de médicos de 3 diferentes hospitales en la ciudad de los Angeles, describieron a 5 hombres jóvenes, de un rango de edad de 29-36 años, que tenían una forma muy poco común de neumonía debida a un protozooario llamado *Pneumocystis carinii*. Este tipo de neumonía se había encontrado exclusivamente en pacientes con daño severo en su sistema inmune ocasionado por alguna enfermedad o droga. Otra infección entre éstos pacientes fue por un virus, llamado, Citomegalovirus, que se encuentra también usualmente en pacientes que tienen una deficiente respuesta inmune.

En julio de 1981, se hizo la observación de que 20 pacientes de la Ciudad de Nueva York y 6 de la Ciudad de California padecían de un tumor de piel conocido como sarcoma de Kaposi (designado así en memoria del dermatólogo Húngaro que lo describió por primera vez: Moritz Kaposi), éste tumor se presenta con baja frecuencia en la población humana, hasta entonces sólo se había detectado en hombres de edad avanzada de origen judío y del mediterráneo; en niños y adultos jóvenes del Africa tropical y en pacientes a los que se les había transplantado un riñón y por tanto, habían sido sometidos a una terapia de drogas para inmunosuprimirlos. En éstos últimos, de la misma manera que en los 26 pacientes de esas ciudades de los Estados Unidos, el tumor creció muy rápido y tomó un curso maligno.

Una característica que presentaron todos los pacientes anteriormente descritos es que eran homosexuales con una vida sexual activa, por lo que la enfermedad se asocio inicialmente a este estilo de vida, sin embargo, a principios de 1983, estudios efectuados en Francia y Bélgica describieron que en países de África, la enfermedad predominaba en pacientes con un estilo de vida heterosexual.

Estos casos de enfermedades infecciosas inusuales y tumores muy poco frecuentes en la historia de la humanidad, fueron el inicio de una de las enfermedades más terribles y devastadoras que, por ser transmitida de una persona a otra y provocar el deterioro del sistema inmune de los pacientes, se le conoce desde entonces como, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida ó SIDA.⁽¹⁾

En 1983, dos años después de que se describieran los primeros casos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, Barre-Sinoussi del laboratorio del Dr. Luc Montagnier y unos meses después R. Gallo y colaboradores identificaron al agente etiológico: el virus de la inmunodeficiencia humana ó VIH.⁽²⁾

1.2 EPIDEMIOLOGIA DEL VIH/SIDA

a) Situación Mundial.

Estimaciones del Programa de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), indican que a finales de 1998 el número de personas que vivían con el VIH era de 33.4 millones, un 10% más que un año antes. En total, desde el inicio de la epidemia hace unas dos décadas, el VIH ha infectado a más de 47 millones de personas, de las cuales, casi 14 millones de ellas, incluyendo niños y adultos han fallecido.

A no ser que se encuentre la cura ó una terapia que prolongue la vida pueda estar ampliamente disponible, la mayoría de las personas que ahora viven con el VIH morirán dentro de una década.

Aproximadamente, 16 000 nuevas infecciones ocurren diariamente. Sólo para 1998 eso significó 5.8 millones de nuevas infecciones, no obstante la amplia información con la que actualmente se dispone para prevenir la transmisión.

En 1998, 590 000 niños fueron infectados con el VIH, principalmente por transmisión vertical, es decir, a través de su madre durante el embarazo, el parto o la lactancia. Desde el inicio de la epidemia 3.2 millones de niños menores de 15 años han fallecido a causa del SIDA y actualmente 1.2 millones de niños menores de 15 años viven con el VIH/SIDA: La comprensión de los aspectos moleculares de la transmisión materno-infantil del VIH y la aplicación oportuna de terapias antivirales han reducido considerablemente el número de infecciones en niños, al menos, en los hijos de la población de mujeres embarazadas que tuvieron acceso a una prueba de tamizaje para el VIH y a tratamiento durante su embarazo.

Son los países en vías de desarrollo los que reúnen a la mayoría de la gente infectada con el VIH. El 89% de la gente infectada vive en el centro y sur de África y en los países en desarrollo de Asia. En algunos países de América Latina la prevalencia de infecciones esta aumentando y en otros, la tendencia de la infección es a estabilizarse o alinearse.⁽³⁾

b) Situación en México

Durante el primer trimestre de 1998 se reportaron 1487 casos de SIDA, lo que representa un incremento de 35% con respecto a 1993 y de 32% con respecto a 1997 para el mismo periodo. El número de casos acumulados hasta el primer trimestre de 1998 suma 35,119, de los cuales 14% son mujeres. La razón de masculinidad es de seis hombres por una mujer, cifra que es similar a la obtenida desde 1988.

El grupo de edad más afectado es el de 20 a 39 años. Este grupo representa 66% de los casos acumulados desde 1983 hasta la fecha.

La región centro sigue siendo la más perjudicada, ya que la tasa acumulada es de 96.3 por 100,000 habitantes. La entidad más afectada es el Distrito Federal, le sigue Baja California y Jalisco. Los estados con menor participación son Guanajuato, Durango y Chiapas.

En adultos, el número de casos notificados por transmisión sexual en el 1^{er} semestre de 1998 fue de 969, lo que representa un incremento de 47% con respecto a 1993 y de 37% con respecto a 1997. La transmisión por vía sanguínea se incremento en 53 casos, esta cifra representa 52% menos que la alcanzada en 1993. De los casos acumulados desde 1983, el porcentaje con categoría de transmisión desconocida es de 28.8%.

Los casos pediátricos en ese mismo semestre fueron 38, es decir, 14 más que en 1993 y 16 más que en 1997. Del total de casos acumulados en niños y niñas desde 1983, la transmisión perinatal representa aproximadamente 63% y la transmisión sanguínea 35.2%. El número de casos cuya categoría de transmisión es desconocida era de 21.5%.

Hasta diciembre de 1998 el número de casos acumulados era de 38, 390; de los cuáles 52.7% están muertos, 40.4% aún vive y de 6.8% se desconoce su situación. En relación con la institución de salud donde se atendieron, 47.7% pertenece a la Secretaría de Salud (SSA), 34.2% al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), 6.7% al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y 11.4% a otras instituciones.⁽⁴⁾

c) Vías de transmisión

La infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) únicamente puede ocurrir por alguna de las siguientes tres vías: sexual, sanguínea y vertical ó perinatal. La vía sexual implica tener relaciones sexuales con intercambio de fluidos biológicos con una persona infectada; la vía sanguínea sucede cuando la sangre de una persona infectada entra en el torrente sanguíneo de una persona no infectada por efecto de una transfusión de sangre o hemoderivados (plasma, plaquetas, etc.) ó por intercambiar agujas, jeringuillas u otros instrumentos contaminados con el VIH. La transmisión vertical o perinatal se refiere a la infección de un bebé a través de su mamá, que puede acontecer durante el embarazo, en el momento del parto ó en la lactancia.⁽⁵⁾

1.3 EL AGENTE ETIOLOGICO

a) Clasificación

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-1), es miembro de la *subfamilia Lentivirinae, familia Retroviridae*, que posee su material genético en forma de dos cadenas sencillas de ácido ribonucleico (ARN), se ha colocado en la familia de retrovirus debido a que su material genético de ARN debe ser transcrito a ácido desoxirribonucleico (ADN) para que el virus pueda completar su ciclo replicativo. La transcripción del ARN viral en ADN es llevada a cabo por una enzima, la transcriptasa reversa.^(6,7) Esta familia se divide en tres *subfamilias: Spumavirinae, Oncovirinae y Lentivirinae*. Los espumavirus se comportan generalmente como contaminantes de los cultivos celulares primarios, donde dan lugar a una característica degeneración celular espumosa, aunque se han hallado en diversas especies de mamíferos (felinos, bovinos y primates), aparentemente no causan infecciones persistentes. Los oncovirus se caracterizan principalmente por inducir procesos neoplásicos en diferentes especies de vertebrados e invertebrados, en humanos se han hallado los virus tipo I y II que ocasionan leucemia de las células T (HTLV-I y HTLV-II). Y finalmente, los lentivirus, palabra que en latín significa *lentus* = lento, que se refiere a los virus capaces de infectar latentemente y a largo plazo a un organismo hospedero, produciendo enfermedades que son lentamente progresivas y generalmente fatales. Algunos lentivirus encontrados en animales son el virus visna-maedi, de ovejas, causante en ellas de alteraciones neurológicas progresivas tras un prolongado periodo de latencia; el virus de la inmunodeficiencia del simio, en los monos rhesus, en quienes provoca SIDA; el virus de la artritis caprina con encefalomiелitis y el virus de la anemia infecciosa equina, entre otros.^(7,8,9) En humanos, se han identificado dos tipos de lentivirus, el VIH-1 y el VIH-2, ambos pueden causar inmunodeficiencia, sin embargo, la infección con el VIH-1 parece ser más virulenta.⁽¹⁰⁾

b) Estructura

El VIH-1 y el VIH-2 poseen un núcleo en forma de cono, la cápside, formada por una proteína llamada p24 (ver figura 1). Dentro de esta cápside o nucleóide se encuentra el genoma viral, constituido por dos bandas idénticas de ARN que tienen a su lado a la DNA polimerasa dependiente de ARN, mejor conocida como transcriptasa reversa, identificada por las proteínas p66 y p51, y a las proteínas de la nucleocápside p9 y p6. La porción interna de la membrana viral esta rodeada por una proteína nuclear miristilada, p17, la cuál proporciona la matriz de la estructura viral y es vital para la integridad del virión. En asociación con el núcleo están las proteínas Vif y Nef; se han estimado de 7 a

20 moléculas de Vif por virión. También se han encontrado dentro del virión y, quizás en la parte externa del núcleo, a productos de genes virales accesorios, Vpr, ó Vpx para el VIH-2, y a la proteína Tat. Estas proteínas virales dentro del virión sugieren que juegan un papel en los eventos tempranos de la infección con el VIH. La superficie del virus esta característicamente compuesta de 72 protuberancias que consisten en trimeros o tetrameros de las glicoproteínas de la envoltura. Estas glicoproteínas se derivan de una proteína precursora de 160 Kd, conocida como gp 160, la cuál es proteolíticamente dividida dentro de la célula (muy probablemente por enzimas celulares en el aparato de Golgi) en dos proteínas de la envoltura externa, una proteína transmembranal, gp 41, y otra llamada gp120. En general, el virión tiene cerca de 100 veces más proteína p24 que gp 120 de la envoltura y 10 veces más p24 que la molécula de polimerasa.⁽¹¹⁾

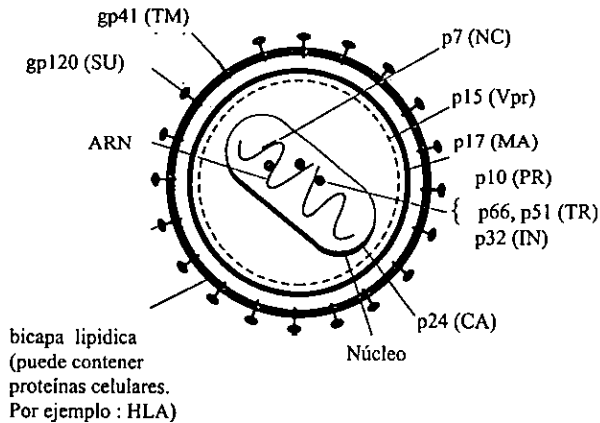


Figura 1. Un virión del VIH con sus proteínas estructurales y algunas otras (Levy, 1998).

c) Organización genómica

El genoma del VIH tiene un tamaño de aproximadamente 9.7 Kb (ver figura 2), contiene tres genes estructurales que codifican para proteínas que propórcionan al virión las características físicas tales como: forma, tamaño, integridad estructural y compartamentalización. Estos genes son gag, pol y env. El gen gag codifica a una proteína precursora que es hendida después de la traducción para formar productos de la nucleocápside. El producto principal de este gen es una proteína con un peso molecular de 24 Kd (p24). El gen pol codifica para proteínas enzimáticas como la proteasa, transcriptasa reversa, integrasa y ribonucleasa H. El gen env codifica a una proteína precursora glicosilada, gp160, la cual es hendida para producir una glicoproteína de la superficie externa, gp120, y una proteína transmembranal, gp41. El VIH posee además un complejo sistema de 6 genes regulatorios que codifican a proteínas que tienen un importante papel en el ciclo de replicación viral. Dos de estos genes, llamados, tat y rev, son necesarios para la replicación viral en todas las células hospederas. El

gen *tat* (trans-activador de la transcripción) codifica a una proteína de 14 Kd utilizando exones de tres diferentes regiones del genoma del VIH y se sintetiza tempranamente después de la infección. La proteína Tat potencia la expresión de los genes del VIH interactuando con factores celulares y enlazando a secuencias del ARN que responden a la transactivación (TAR), localizadas en la región 5' terminal de todos los transcritos del virus. El gen *rev* (regulador de la expresión de las proteínas del virión) codifica a una proteína de 19 Kd que enlaza dentro del núcleo a los ARN's del virus en secuencias localizadas dentro del gen *env* conocidas como elementos de respuesta a *rev* (RRE). La proteína Rev actúa después de la transcripción facilitando la acumulación citoplasmica y traducción de los ARN's que contienen RRE, se requiere por lo tanto, para la expresión de las proteínas estructurales e indirectamente regula su propia expresión, así como la de *tat* y *nef*. El gen *nef* se asocio inicialmente con una disminución en la eficiencia de propagación del virus en cultivos celulares, por lo que se le nombró debido a esto factor negativo (*nef*), sin embargo, in vivo se ha observado que aumenta la replicación viral a muy altos niveles. El gen *vif* (factor de infectividad viral) codifica una proteína que es esencial para la propagación del VIH-1 en linfocitos T de sangre periférica y en macrófagos primarios, así como en algunas líneas celulares. También parece ser importante en la transmisión viral libre de células y de una célula a otra. El gen *vpr* (proteína R del virión) codifica una proteína de 15 Kd que se asocia con la proteína p6 de la nucleocápside; es indispensable para que el virus se replique en linfocitos T y parece aumentar la replicación del VIH-1 y del VIH-2 en macrófagos. El gen *vpu* (proteína U del virión) esta presente en el VIH-1 pero no en el VIH-2; se requiere para la disociación intracelular de gp160 y la molécula de CD4 a través de la degradación de CD4 en el retículo endoplasmico; juega un papel en el ensamblaje eficiente del virión y en su liberación. El gen *vpx* (proteína X del virión) no esta presente en el VIH-1 pero sí lo esta y en grandes cantidades en el VIH-2. La proteína *vpx* se encuentra en el virión en la parte exterior de la estructura nuclear, lo que sugiere que puede participar en la penetración del virus hacia la célula.^(6,10,11)

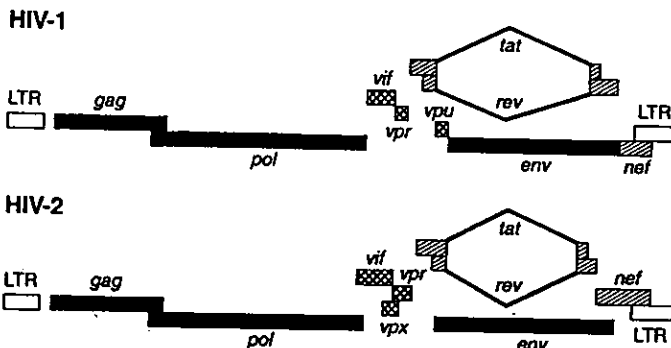


Figura 2: Mapa genómico del VIH tipo 1 y del VIH tipo 2 ; obsérvese la presencia de *vpu* en el VIH - 1 y de *vpx* en el VIH - 2, (Levy, 1998)

d) Ciclo de replicación

La unión de las partículas infecciosas del VIH por medio de la glicoproteína de la envoltura viral, gp120, a un receptor de la superficie celular: la molécula CD4, no es suficiente para permitir la entrada del virus a la célula; se requieren otros factores de la superficie celular ó coreceptores conocidos como receptores de quimocinas. Las quimocinas comprenden a una familia de citocinas de bajo peso molecular que promueven la inflamación del sitio de la infección ó daño por reclutamiento a ese lugar de células del sistema inmune. La fusión directa de las membranas de la célula hospedera y la del virus, por efecto de sus respectivas moléculas receptoras, es lo que permite la entrada exitosa del virión a la célula (ver figura 3). Después del enlace y la internalización, la cápside del virus es parcialmente descubierta para formar un ADN complementario de banda sencilla utilizando la transcriptasa reversa codificada por el virus; esta enzima también sintetiza otra hebra de ADN para producir un ADN copia de doble banda formada a partir del genoma original de ARN del VIH. La transcripción reversa inicia en la partícula viral antes de que ocurra la infección y termina sólo cuando esa ha ocurrido. El complejo de preintegración resultante de la transcripción reversa, que comprende al ADN lineal de doble hebra, a la proteína de la matriz, a la proteína accesoria Vpr y a la integrasa viral (IN); es transportado hacia el núcleo, en dónde la integrasa lleva a cabo la función de exonucleasa del ADN lineal de doble banda, rompimiento endonucleolítico del ADN cromosomal del hospedero y ligación ajustada de este ADN y el del virus. Una vez integrado, el ADN proviral puede permanecer latente si no hay activación celular, restringiéndose así el ciclo replicativo. Sin embargo, si la célula se encuentra activada, una variedad de factores transcripcionales del hospedero van a reconocer y enlazar regiones del VIH que son elementos inductores de la transcripción viral. Los genes que codifican proteínas virales regulatorias son los encargados de potenciar la transcripción de todos los demás genes virales, incluyendo la expresión de los genes que codifican para proteínas estructurales del virión. Durante la traducción las proteínas virales son sometidas a varios procesos que incluyen: rompimiento proteolítico, glicosilación, miristilación y fosforilación. El ensamblaje del núcleo del virión conteniendo al ARN del virus, proteínas virales modificadas y enzimas, ocurre en la membrana plasmática. Los viriones maduros se forman al emerger a través de la membrana celular para adquirir en ese evento la bicapa lipídica más externa que contiene a las glicoproteínas de la envoltura externa (gp120) y transmembranal (gp41).^(11,12,13)

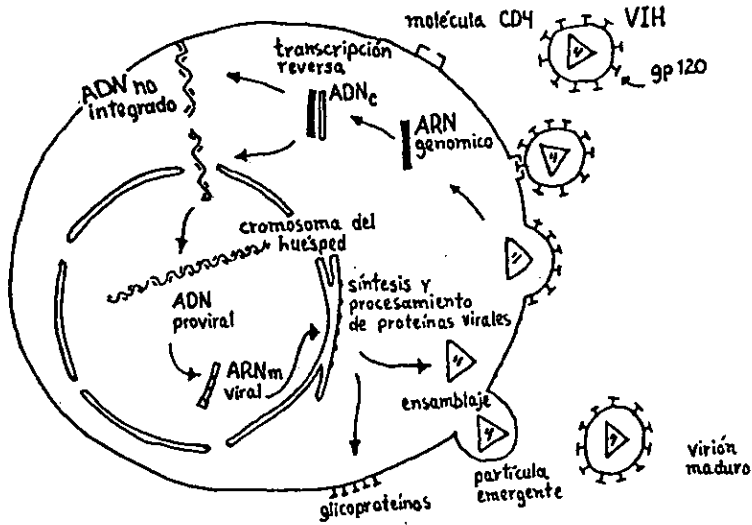


Figura 3. Ciclo replicativo del VIH, (Connor, 1992).

1.4 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION

Después de la infección primaria por el VIH hay un periodo inmunológicamente silencioso antes del desarrollo de anticuerpos detectables, éstos aparecen generalmente de 2 a 8 semanas después del inicio de la infección. El periodo de tiempo comprendido desde el momento en que ocurrió la infección hasta aquél en el que el paciente genera anticuerpos detectables en contra del virus es conocido como "periodo ventana". Durante ese tiempo una prueba de detección de anticuerpos hacia el agente infeccioso va a resultar negativa aunque el individuo se encuentre verdaderamente infectado. El antígeno p24 en suero (antigenemia p24) aparece en las primeras semanas de la infección y por lo general precede a la seroconversión. Los anticuerpos a las proteínas del gen env (gp41, gp120 y gp160) son los primeros en encontrarse mientras que los anticuerpos a proteínas codificadas por los genes gag y pol son producidos simultáneamente poco tiempo después.⁽⁶⁾ (ver figura 4)

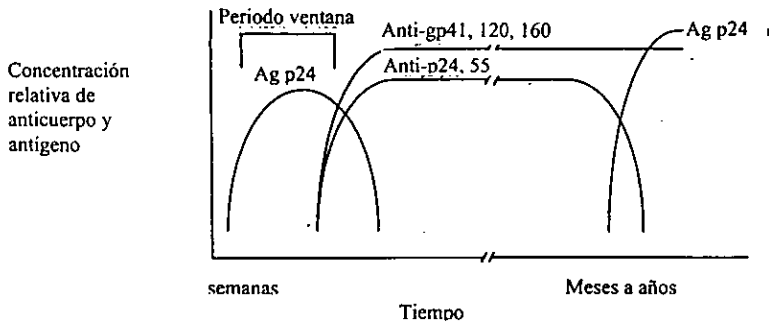


Figura 4. Antigenemia y respuesta de anticuerpos durante la infección con el VIH, (Constantine, 1992).

1.5 PATOGÉNESIS

De una a tres semanas después de la infección, la mayoría de los pacientes exhiben una enfermedad parecida a fiebre glandular asociada con un alto título de virus en la sangre y una disminución en el número de los linfocitos T CD4+. En poco tiempo, una vigorosa respuesta inmune celular y humoral provoca que en un mes ó más la viremia disminuya a niveles casi indetectables. Los linfocitos T citotóxicos CD8+, las células naturales asesinas (NK) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos pueden participar en conjunto para que se efectuó la disminución de la carga viral mediante la lisis de las células infectadas mientras los anticuerpos neutralizantes pueden eliminar a los viriones libres. Después, un largo periodo asintomático de "latencia clínica", con una duración desde 1 hasta 15 años ó más (el promedio es de aproximadamente 10 años), puede transcurrir para que cualquier evidencia clínica de la enfermedad se manifieste. Durante ese periodo, muy bajos títulos de virus logran detectarse en sangre y una pequeña cantidad de células T CD4+ circulantes están produciendo virus; sin embargo, niveles muy altos de virus y una gran cantidad de células infectadas pueden detectarse en los nódulos o ganglios linfáticos. Con el paso del tiempo hay una declinación estable en el número de las células T CD4+ así como regresión o deterioro de los folículos linfoides. Cuando el conteo de los linfocitos T CD4+ cae entre 200-400 por μl pueden ocurrir infecciones causadas por algunos microorganismos oportunistas, a los que el sistema inmune debilitado no puede hacerles frente. La activación de las células T CD4+ infectadas contribuye a la replicación viral, de tal manera, que grandes cantidades de viriones salen de los nódulos linfáticos degenerados hacia el torrente sanguíneo. El aumento en la carga viral y la disminución en el número de los linfocitos T cooperadores favorecen el cambio de una infección crónica de grado inferior hacia una infección de progresión rápida. El resultado de las enfermedades infecciosas, tumores malignos y alteraciones profundas en el organismo que ocasionan en el paciente un gran adelgazamiento, es finalmente, su fallecimiento.⁽¹⁴⁾

1.6 PRUEBAS DE DETECCIÓN DEL VIH

El diagnóstico de la infección por el VIH se basa en las pruebas que detectan anticuerpos contra el virus. Estas pruebas se clasifican en: pruebas iniciales de detección o tamizaje y pruebas suplementarias o confirmatorias. Las pruebas de tamizaje son las de ELISA, aglutinación y las pruebas rápidas con formato de inmunodot.⁽¹³⁾

La prueba de ELISA se ha dividido en diferentes tipos: indirecta, competitiva, en sandwich y de captura. En el ensayo indirecto, el tipo más común de ELISA, el antígeno del VIH se encuentra revestido en una fase sólida, comúnmente pozos de una microplaca; a los cuáles se añade la muestra del paciente que contiene anticuerpos en contra de los antígenos del virus, posteriormente, se agregan anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulina humana conjugados con una enzima, que es capaz de modificar un sustrato para formar un producto coloreado. En los ELISA's competitivos los anticuerpos de la muestra del paciente y los del conjugado, que también puede reconocer directamente a componentes del virus, se añaden al mismo tiempo al antígeno revestido en los pozos para competir por él. En este caso, un resultado positivo es aquél en el que no hubo desarrollo de color, pues, si la concentración de anticuerpos en la muestra del paciente es alta, el conjugado va a unir poco antígeno. En el ELISA en sandwich el antígeno revestido en los pozos de la microplaca se une al anticuerpo proveniente de la muestra del paciente, sin embargo, debido a su carácter ambivalente, el anticuerpo puede enlazar otro antígeno viral marcado con una enzima. Esto forma un sandwich de antígeno/anticuerpo/antígeno marcado. Finalmente, los ELISA's de captura de antígeno y anticuerpo, que consisten, el primero, de un anticuerpo monoclonal revestido en los pozos de la microplaca y que, generalmente, tiene ya capturado o enlazado al antígeno viral específico; el procedimiento a seguir es el mismo que el de los ensayos tipo indirecto o competitivo; y, el segundo, que posee en la fase sólida un revestimiento de anticuerpos anti-IgG's los cuáles van a capturar al total de anticuerpos IgG's de la muestra, éstos van a unir al antígeno viral marcado enzimáticamente para posteriormente sólo añadir el sustrato.⁽⁶⁾

Las pruebas del VIH basadas en el fenómeno de la aglutinación consisten de un sistema de "acarreadores", por ejemplo: partículas de látex, microperlas o eritrocitos humanos, que traen consigo un revestimiento de antígenos virales. La interacción de estos antígenos con los anticuerpos de la muestra del paciente va a producir una red o enrejado que puede visualizarse en forma de aglutinación o agrupamiento de las partículas revestidas con el antígeno viral.⁽⁶⁾

Las pruebas de detección del VIH que comúnmente poseen como antígeno viral un péptido sintético o recombinante transferido a un pequeño círculo de papel de nitrocelulosa (NC) se conocen como ensayos en punto o dot-blot. La fase sólida se encuentra en un dispositivo de plástico que además contiene almohadillas absorbentes bajo el papel de NC para colectar el suero y los reactivos.⁽⁶⁾

Las pruebas suplementarias o confirmatorias tales como la inmunofluorescencia indirecta (IFA), el ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) y el Western blot (WB), sólo se recomiendan en muestras que han sido reactivas en los ensayos de tamizaje. El Western blot es el ensayo confirmatorio más ampliamente utilizado para la detección de anticuerpos en contra del VIH-1. Este ensayo implica que un lisado de antígenos del VIH-1 sean separados a lo largo de un gel de poliacrilamida por medio de un campo eléctrico y en presencia del detergente aniónico: dodecilsulfato de sodio (SDS), el cuál, al desnaturalizar las proteínas virales y neutralizar sus cargas confiriéndoles un carácter negativo, ocasiona que la separación de las proteínas se lleve a cabo solamente debido a su peso molecular. La inmunodetección de las proteínas virales se efectúa de modo idéntico al procedimiento del ELISA tipo

indirecto con la única diferencia de que se realiza en hojas de nitrocelulosa que ya poseen, por transferencia pasiva, los antígenos separados en el gel. Los resultados obtenidos en el Western blot pueden ser positivos, negativos o indeterminados si no cumplen con los criterios de positividad descritos en la tabla 1. Un resultado es negativo cuando no se detecta ninguna banda viral. A los pacientes con resultados indeterminados se ha sugerido darles un seguimiento hasta los 6 meses después de su última prueba para observar seroconversión y, por lo tanto positividad, si tienen realmente la infección o, descartarla si permanecen aún indeterminados.⁽⁶⁾

Criterios para la interpretación de los WESTERN BLOT

INSTITUCION	CRITERIOS
CDC* / USA	Dos bandas de las siguientes: p24, gp41, gp120 ó gp160
CRSS**	Al menos dos bandas de: p24 ó p31 y gp120/160
CRUZ ROJA / USA	Al menos una banda de cada producto de gen: env, gag, pol
FDA***	p24, p31 y gp41 ó gp120 ó gp160
OMS****	Al menos dos bandas de productos del gen env

CDC* (Centro para el control de enfermedades); CRSS** (Consortio para la estandarización de la serología de retrovirus); FDA*** (Administración de alimentos y drogas); OMS**** (Organización mundial de la salud).

Tabla 1

1.7 ANTECEDENTES

Los resultados indeterminados en el Western blot, además de aparecer en la infección temprana y avanzada con el VIH, se han observado en personas no infectadas con el virus.⁽¹⁶⁾ Moore *et al* en 1989 al diseñar un ELISA con antígenos de la envoltura, gp 120 y gp 160, solubilizados de diferentes cepas del VIH por medio de un detergente no desnaturizante, no lograron resolver el diagnóstico de un panel de sueros indeterminados, pero en otras series de sueros sí lograron detectar anticuerpos en contra de esos antígenos, que los llevó a sugerir que podría utilizarse para realizar un seguimiento de los estados tempranos de seroconversión y en muestras reactivas en ELISAS pero con Western blots indeterminados.⁽¹⁷⁾ Celum *et al* reportaron en 1991 que aproximadamente un 10-20% de los sueros que son reactivos por ELISA resultan indeterminados en el Western blot e intentaron resolver este problema diagnóstico con ayuda de otras pruebas suplementarias como el cultivo viral, PCR, ensayos de antígeno p24, RIPA y el uso de antígenos recombinantes, aunque encontraron que poseen, en general, una excelente especificidad, la sensibilidad no pudieron estimarla debido al bajo número de seroconvertidores; además, son técnicas que implican ciertas dificultades técnicas y son muy

costosas.^(18,19) Zaaijer *et al* en 1992 se cuestionaron si se disminuía el valor del Western blot como prueba confirmatoria cuando sus resultados demostraron que los ensayos inmunoenzimáticos de 3^{ra} generación y la prueba de antígeno al VIH daban positivas en las etapas tempranas de la infección mientras que en el Western blot el resultado era todavía negativo o poseía sólo algunas bandas virales que no definen el diagnóstico (generalmente anticuerpos que detectan p24 y gp160).⁽²⁰⁾ Simon *et al* también en 1992, confirmaron los resultados de Zaaijer al compararlos con los que ellos obtuvieron de 8 muestras de seroconvertidores tempranos, negativos en el Western blot, que sometieron a ensayos inmunoenzimáticos de 1^{ra}, 2^a y 3^{ra} generación, así como al ensayo de antígeno p24, que resultó positivo en todas las muestras. Evidenciaron que, no obstante que los ensayos de 3^{ra} generación son más altamente sensitivos que los de 1^{ra} y 2^a para diagnosticar la infección primaria con el VIH, no deben usarse como recurso único ya que pueden dar valores negativos en muestras que por ensayos de 2^a generación y antígeno p24 resultan ser positivas, por lo que se tienen que auxiliar con otros ensayos inmunoenzimáticos junto con la prueba de antígeno p24.⁽²¹⁾ Nair *et al* en 1994 diseñaron un ensayo inmunoenzimático que utiliza a la glicoproteína gp 160 en su forma nativa como antígeno viral, con el que obtuvieron una sensibilidad del 100% y redujeron a cero los resultados falsos positivos en comparación con dos ensayos comerciales, uno que utiliza antígenos recombinantes y el otro que usa lisados virales. Estos resultados los motivó a proponer una evaluación de su ensayo en muestras indeterminadas en la etapa temprana de seroconversión y positivas débiles en Western blot, para eliminar incluso, la necesidad de una segunda prueba que confirme la infección con el VIH.⁽²²⁾ Otra vez Zaaijer *et al* en 1997, reportaron resultados de la comparación entre el Western blot convencional y dos ensayos de inmunoblots comerciales que utilizan como antígenos del virus a péptidos recombinantes y sintéticos, en los que obtuvieron una sensibilidad del 80 y del 70%, respectivamente, con una muestra de 30 seroconvertidores. La especificidad que observaron en sus ensayos de inmunoblot fue del 83% al lograr resolver 20 muestras de un panel de 24 que mostraron falsa reactividad en el Western blot convencional. Aunque sus 2 inmunoblots resultaron negativos en una muestra tomada en etapa temprana de seroconversión, sugirieron evaluarlos con un mayor número de muestras para intentar alcanzar, al menos, la sensibilidad del Western blot y así, poder sustituirlo por los que ellos diseñaron.⁽²³⁾

Debido a los resultados obtenidos en sus experimentos, Simon y Zaaijer, manifestaron su desdén a utilizar el Western blot en la etapa temprana de seroconversión y aún, expresaron su desacuerdo en continuar nombrándolo el estándar de oro para el diagnóstico serológico de la infección con el VIH. Sin embargo, motivados por los resultados que obtuvieron Nair y colaboradores al utilizar a la glicoproteína gp160 en su forma nativa como el antígeno viral en un ELISA que ellos diseñaron, y también, por el hecho de que el Western blot lleva en sí la pérdida total de la conformación nativa de las proteínas a causa de los agentes desnaturalizantes a los que son sometidas, lo que significa que los anticuerpos presentes en el suero o plasma de alguien infectado encontrarán únicamente epítopos en forma lineal y no conformacional; en este trabajo, se ha planteado la siguiente hipótesis: en personas en las que se obtuvo un resultado indeterminado en el Western blot, puede deberse a que sus anticuerpos reconozcan principalmente epítopos conformacionales, por lo tanto, para que esto ocurra, se necesita que la proteína se encuentre en su forma nativa ó por lo menos, que conserve parcialmente alguna estructura conformacional.

Para responder la hipótesis planteada se propusieron los siguientes:

2. OBJETIVOS

- 1.-Comparar el efecto de la desnaturalización parcial en el reconocimiento de las proteínas del VIH-1 en sueros de pacientes diagnosticados como indeterminados.
- 2.-Determinar la capacidad de resolver diagnósticos indeterminados.

A su vez, la estrategia experimental propuesta para el cumplimiento de los objetivos fue:

Obtención del antígeno del VIH-1 en cultivo



lisado del virus por el WB tradicional, ← ← ↔ → → lisado del virus por el WB modificado,
incluye al ditioneitol (DTT) no incluye al DTT



Realización y corrimiento de geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS)



Transferencia pasiva de los antígenos separados a un soporte sólido de nitrocelulosa y su preparación en tiras conteniendo proteínas virales tratadas y no tratadas con DTT



Corrimiento simultáneo del WB a 260 sueros problema (obtenidos con un resultado previo de indeterminados) en tiras con DTT y sin DTT



Lectura y registro de bandas reactivas

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Preparación de antígeno del VIH-1 para Western blot (virus libre)

Procedimiento:

1.-Expandir el cultivo en varias botellas F75 (6 F75=1 lote) (para Western blot de diagnóstico emplear HTLV IIIB/LAV/Molt).

2.-Contar las células y ajustar cada frasco a 30 ml de medio de cultivo RPMI 1640 + suero fetal bovino (SFB) al 10% con 5×10^5 a 1×10^6 de células/ml.

3.-Incubar 72 horas.

4.-Pipetear todo el contenido de los F75 a tubos de centrifuga de 50 ml.

5.-Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm.

A su vez, la estrategia experimental propuesta para el cumplimiento de los objetivos fue:

Obtención del antígeno del VIH-1 en cultivo



lisado del virus por el WB tradicional, ← ← ↔ → → lisado del virus por el WB modificado,
incluye al ditiotreitól (DTT) no incluye al DTT



Realización y corrimiento de geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS)



Transferencia pasiva de los antígenos separados a un soporte sólido de nitrocelulosa y su preparación en tiras conteniendo proteínas virales tratadas y no tratadas con DTT



Corrimiento simultáneo del WB a 260 sueros problema (obtenidos con un resultado previo de indeterminados) en tiras con DTT y sin DTT



Lectura y registro de bandas reactivas

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Preparación de antígeno del VIH-1 para Western blot (virus libre)

Procedimiento:

1.-Expandir el cultivo en varias botellas F75 (6 F75=1 lote) (para Western blot de diagnóstico emplear HTLV IIIB/LAV/Molt).

2.-Contar las células y ajustar cada frasco a 30 ml de medio de cultivo RPMI 1640 + suero fetal bovino (SFB) al 10% con 5×10^5 a 1×10^6 de células/ml.

3.-Incubar 72 horas.

4.-Pipetear todo el contenido de los F75 a tubos de centrifuga de 50 ml.

5.-Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm.

- 6.-Filtrar el sobrenadante (SN) por una membrana de 45 μ m.
- 7.-Pasar 25 ml de SN filtrado a tubos de ultracentrifuga del rotor SW 28.
- 8.-Agregar cuidadosamente al fondo de cada tubo 3 ml de solución de sacarosa al 20%.
- 9.-Balancear los tubos con el resto del SN dejando unos milímetros arriba para evitar salpicaduras.
- 10.-Centrifugar por 2 horas a 20000 rpm o 1.5 horas a 25000 rpm a 4°C.
- 11.-Vaciar todo el SN y dejar los tubos boca abajo sobre papel absorbente en una gradilla por aproximadamente 15 minutos para que escurra el líquido por las paredes.
- 12.-Guardar a -20°C (cuando vaya a correrse el gel sacar justo antes de que vaya a cargarse).

Los antígenos virales fueron sometidos a un tratamiento con solución de lisis y posteriormente con dos soluciones de muestra diferentes, la empleada regularmente con ditiotreitól (DTT) y la modificada sin DTT.

Composición y preparado de la solución de lisis RIPA y de las soluciones de muestra 2X.

-Solución de lisis RIPA : Tris base al 0.05 M; NaCl al 0.15 M; SDS al 0.1%; Tritón X-100 al 1%; deoxicolato de sodio (DOC) al 1% y PMSF al 1 mM.

Para 10 ml añadir: 60.55 mg de Tris base; 87.75 mg de NaCl; 10 μ g de SDS; 100 μ g de Tritón x-100 y 100 μ g de deoxicolato de sodio.

-Solución de muestra 2X con DTT: Tris base 0.08 M a un pH de 6.8; SDS al 2%; Glicerol al 10%; DTT al 0.1 M y azul de bromofenol al 0.01%.

Para 10 ml añadir: 3.2 ml de Tris base 0.5 M a un pH de 6.8; 4 ml de SDS al 10%; 2 ml de glicerol; 0.01% de azul de bromofenol y 0.308 g de ditiotreitól. Llevar a 10 ml con agua destilada.

-Solución de muestra 2X sin DTT. A excepción del DTT, se le añaden los demás componentes descritos en la solución de muestra anterior.

3.2. Protocolo para geles de poli(acrilamida) en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS)

Preparación del gel de corrimiento

- 1.-Ensamblar un sandwich con 2 placas de vidrio y dos espaciadores sobre un soporte que puede acoplarse a una cámara de electroforesis.
- 2.-Colocar el sandwich en una posición de vertido.
- 3.-Preparar la solución del gel de corrimiento a una concentración final del 12% a partir de 4 ml de una solución al 30% de acrilamida /bis-acrilamida, 2.5 ml al 2 M de Tris base a un pH de 8.8, 100 μ l de SDS al 10% y 3.35 ml de agua desionizada; desgasificar esta solución utilizando un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío. Agregar 50 μ l de persulfato de amonio al 10% y 5 μ l de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilendiamina); agitar suavemente para mezclar la solución.
- 4.-Utilizando una pipeta aplicar la solución del gel de corrimiento a el sandwich hasta una altura de aproximadamente 7 cm.
- 5.-Utilizando una pipeta Pasteur añadir sobre el gel una capa de aproximadamente 1 cm de agua desionizada.
- 6.-Permitir que el gel polimerize de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.

Preparación y vertido del gel espaciador

- 7.-Preparar la solución del gel a una concentración final del 3% a partir de 0.65 ml de una solución al 30% de acrilamida /bis-acrilamida, 1.25 ml al 0.5 M de Tris base a un pH de 6.8, 50 μ l de SDS al 10% y 3.05 ml de agua desionizada; desgasificar la solución 15 minutos a temperatura ambiente utilizando un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío. Agregar 25 μ l de persulfato de amonio al 10% y 5 μ l de TEMED; agitar suavemente para mezclar la solución.
- 8.-Quitar la capa de agua que se encuentra sobre el gel de corrimiento
- 9.-Utilizando una pipeta añadir la solución del gel espaciador dentro del sandwich sobre el gel de corrimiento previamente formado.
- 10.-Insertar un peine dentro de la capa de la solución del gel espaciador. Vertir rápidamente la solución, de lo contrario puede polimerizar en el matraz.
- 11.-Permitir que el gel polimerize de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.

Preparación de la muestra y cargado del gel

1.-Adicionar a cada botón viral 200 µl de solución de lisis y agitar en vortex un minuto; repartir las proteínas virales disueltas en esta solución en dos tubos eppendorff de 0.5 ml añadiendo 100 µl por cada tubo. Agregar, en una proporción 1:1 (v/v) a uno de los tubos eppendorff la solución de muestra 2X con DTT; al otro tubo eppendorff añadir también en la misma proporción la solución de muestra 2X pero sin DTT. Agitar en vortex ambos tubitos durante un minuto.

2.-Quitar cuidadosamente el peine sin rasgar los bordes de los pozos del gel

3.-Colocar el soporte que contiene el sandwich con el gel dentro de una cámara para añadir la solución de corrida. Finalmente, sin hervir las muestras, realizar su cargado en los geles.

Es necesario mencionar aquí dos puntos importantes, el primero es que durante la estandarización de la metodología que empleamos en este trabajo, encontramos que al realizar el procedimiento convencional de hervir las muestras de antígeno antes de añadirlas a los geles, perdimos la detección de la glicoproteína gp160 en el WB, por lo que por este motivo decidimos no hervirlas; y segundo, para evitar el sobrecargado de antígeno en los geles, se determinó el volumen de antígeno añadido a cada gel realizando una corrida previa con un peine de carriles en los que se añadieron por duplicado diferentes volúmenes de la muestra de antígeno que correspondieron a un mismo lote, se selecciono aquél volumen que otorgó un patrón de bandas completo, intenso y bien definido en el Western blot. De esta manera, a uno de los 2 geles se le añadió la muestra de antígeno tratada con DTT y al otro gel se le añadió ese mismo volumen de antígeno pero sin DTT. Cada que se terminaba un lote de antígeno se repetía este mismo procedimiento con un nuevo lote.

4.-La corrida de los geles se realizó a 200 volts durante un tiempo aproximado de una hora.

Preparación de soluciones base para realizar los geles de poliacrilamida.

-Acrlamida/bis-acrilamida al 30% en agua desionizada.

Disolver 29.2 g de acrilamida (grado electroforesis) y 0.8 g de N,N'-metilen-bis-acrilamida (grado electroforesis) en 40 ml de agua desionizada. Aforar hasta un volumen de 100 ml. Filtrar la solución a través de una membrana de 0.45 µm. Almacenar a 4 °C en la oscuridad. Desechar después de 30 días esta solución debido a que la acrilamida gradualmente se hidroliza hasta ácido acrílico y amonio.

-Tris base 2 M, pH 8.8.

Disolver 24.2 g de Tris base en 40 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N. Aforar hasta un volumen de 100 ml de agua. Almacenar a 4 °C.

-Tris base 0.5 M, pH 6.8.

Disolver 6.05 g de Tris base en 40 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N. Agregar agua hasta un volumen total de 100 ml. Almacenar a 4 °C.

-Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%.

Disolver 10 g de SDS en 100 ml de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

-Persulfato de amonio al 10%.

Disolver 50 mg de persulfato de amonio en 0.5 ml de agua. Preparar esta solución el mismo día que se va a utilizar.

-Solución de corrida 5X: Añadir 15 g de Tris base, 72 g de Glicina y 5 g de SDS a un volumen de agua; ajustar el pH a 8.3, aforar con agua bidestilada hasta 1000 ml.

Al término de la corrida se tomaron los geles para efectuar la transferencia de los antígenos separados en ellos a hojas de nitrocelulosa, de acuerdo al siguiente procedimiento:

3.3 .Transferencia pasiva de los antígenos separados a un soporte sólido de nitrocelulosa

1.- Cortar 2 hojas de nitrocelulosa de 9 cm de ancho por 8.25 cm de largo; dejarlas remojar en solución de transferencia 1X por lo menos media hora junto con varias hojas de papel filtro grueso cortadas un poco más grandes que las hojas de nitrocelulosa.

2.-Sacar el gel de la cámara separando con cuidado los vidrios, desechar el gel concentrador y colocar el gel de corrimiento dentro de un sandwich montado de la siguiente manera:

2a.-Sobre un pedazo grande de papel aluminio poner plástico Ega pack que lo cubra totalmente, a su vez, colocar una placa de vidrio ligeramente más grande que el gel que vaya a transferirse.

2b.-Encima del vidrio poner 4 hojas de papel filtro humedecidas en solución de transferencia, colocar una de las hojas de nitrocelulosa sobre este papel filtro y el gel sobre ésta.

2c.-La otra hoja de nitrocelulosa se pone enseguida y luego otras 4 hojas de papel filtro sobre las cuales va a colocarse otra placa de vidrio.

2d.-Cerrar el paquete envolviéndolo con el Ega pack y papel aluminio, colocar un peso encima (usualmente un garrafón con una capacidad de 20 lt de agua) y dejar transfiriendo 72 horas, es decir, hasta el tercer día.

Solución requerida en la preparación de la transferencia pasiva

-Solución de Transferencia 10x: Agregar 29.22 g de NaCl; 6.72 g de EDTA y 12.11 g de Tris base a un volumen de agua; ajustar el pH a 7.0. Aforar con agua bidestilada a 1000 ml.

Una vez concluido el tiempo establecido para transferir los antígenos virales de los geles de poliácridamida hacia el soporte sólido de las hojas de nitrocelulosa, éstas se recuperaron para realizar su bloqueado y controlarlas.

3.4 .Bloqueo de las nitrocelulosas

1.- Desmontar el sistema de transferencia pasiva y recuperar las dos hojas de nitrocelulosa. Trazar una línea con un lápiz de color en el límite en el que el gel ya no está en contacto con la hoja de nitrocelulosa. En esta región poner una identificación a la nitrocelulosa escribiendo: fecha en la que se realizó la corrida del gel y el bloqueo de la hoja, iniciales de quién llevó a cabo el trabajo, nombre de la cepa viral y línea celular infectada.

2.-Colocar las hojas de nitrocelulosa en una charola para añadir 25 ml de solución de bloqueo (albúmina bovina al 3% en PBS).

3.-Incubar a 37°C durante una hora y en agitación.

4.-Lavar 3 veces durante 5 minutos cada vez y en agitación con solución de lavado (Tween 20 al 0.2% en PBS).

5.-Permitir el secado de las hojas de nitrocelulosa sobre papel filtro.

3.5 .Control de las nitrocelulosas ya transferidas

Cada hoja de nitrocelulosa se controló para comprobar cantidad y calidad de antígeno, para ello, se cortaron dos tiras de aproximadamente 3 mm de ancho en cada hoja y se corrió el procedimiento completo de inmunoblot o Western blot con un suero control positivo y con un suero control negativo. Estas 2 tiras se guardaron junto con el carril de marcadores de peso molecular preteñidos corridos en ese mismo gel, indicando a que hoja corresponden.

3.6. El material biológico: las muestras de suero

Después de haber controlado las hojas de nitrocelulosa y determinar que son utilizables por la aparición de un patrón de bandas de las proteínas virales que es completo y bien definido en la tira correspondiente al control positivo, se procedió a realizar los Western blot a un total de 260 sueros seleccionados por un resultado indeterminado previo. Estos sueros fueron enviados a la Unidad entre 1995 y 1997 por el Consejo Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CONASIDA) con resultado presuntivo positivo (positivos a ELISA) para realizar el ensayo confirmatorio del Western blot. Se realizaron dos Western blot con cada suero, uno con antígeno **tratado con DTT**, que corresponde al método tradicional, y el otro con antígeno **no tratado con DTT**, que corresponde al método modificado. En cada corrida se incluyó un suero control positivo y uno control negativo.

3.7 Procedimiento del inmunoblot o Western blot

Reacción con el suero

- 1.-Diluir el suero humano control positivo, el suero humano control negativo y los sueros problema, en solución de dilución (albúmina bovina al 1% y tween 20 al 0.2% en PBS) en proporción 1:100 (se añaden 10 μ l de suero a 1 ml de solución de dilución) y añadirlos a los canales de la charola que contienen las tiras correspondientes a esos sueros.
- 2.-Cubrir la charola e incubar a 37°C por una hora y en agitación.
- 3.-Aspirar el sobrenadante a un matraz kitasato con benzal con una bomba de vacío.
- 4.- Lavar 3 veces con solución de lavado por 5 minutos y con agitación suave.

Reacción con el anticuerpo anti Ig-G biotinilado

- 5.-Diluir el anti Ig-G humano en solución de dilución en proporción 1:1000 (añadir 1 μ l del anticuerpo a 1 ml de solución de dilución).
- 6.-Tirar la solución de lavado y añadir un ml del anti Ig-G humano diluido a los canales que contienen las tiras.
- 7.-Cubrir la charola e incubar a 37°C por una hora y en agitación.

Reacción con la peroxidasa biotinilada

- 8.-Al terminar la incubación, tirar la solución y lavar las tiras 3 veces con solución de lavado por 5 minutos cada vez y en agitación.
- 9.-Diluir la peroxidasa biotinilada en solución de dilución en proporción 1:500 (2 μ l en 1 ml de buffer de dilución).
- 10.-Añadir un ml de esta dilución a cada canal de la charola que contiene las tiras.
- 11.-Cubrir la charola e incubar a 37°C durante una hora y con agitación.

Desarrollo del color

- 12.-Después de la incubación tirar la solución y lavar la hoja de nitrocelulosa 2 veces con solución de lavado por 5 minutos y en agitación.
- 13.-Lavar una vez más solo con PBS por 5 minutos y en agitación.
- 14.-Preparar el reactivo de revelado: diaminobenzidina (DAB) al 0.05% en PBS.
- 15.-Tirar el PBS del último lavado.
- 16.-Añadir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a la solución de DAB, a una concentración de 0.05% (50 μ l de H_2O_2 por cada 100 ml de solución de DAB). Esta solución debe usarse antes de 10 minutos.
- 17.-Añadir un ml de esta solución a las tiritas y observar la aparición de bandas en el control positivo.
- 18.-Cuando aparezcan las bandas en el control positivo tirar la solución y lavar las tiras con agua para parar la reacción.
- 19.-Secar las tiras de nitrocelulosa sobre papel filtro.

4. RESULTADOS

En la figura 1 se muestra el efecto que tiene el hervir o no una muestra de lisado viral, tratado con DTT, antes de añadirla a un gel de acrilamida. Puede observarse que en la muestra sin hervir se detectan claramente las glicoproteínas 120 y 160, mientras que cuando se hierve la muestra viral se disminuye considerablemente la detección de gp160.

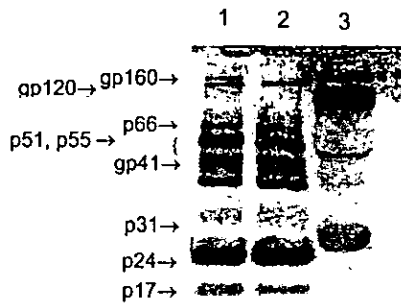
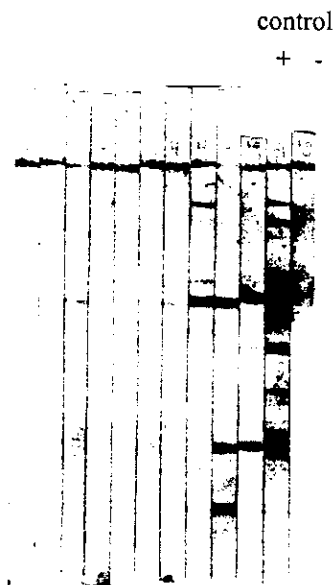


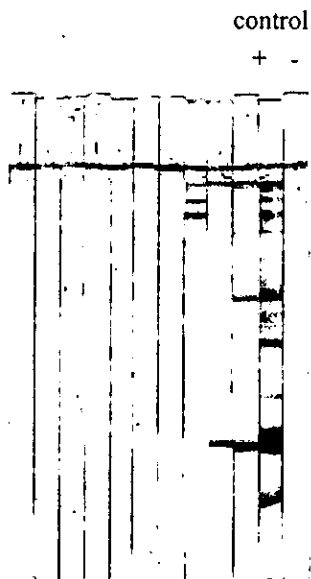
Figura 1. canal 1: muestra de lisado viral no hervida; canal 2 : muestra de lisado viral hervida; canal 3: mezcla de marcadores de peso molecular.

A continuación se presentan fotografías de los WB realizados a cada uno de los sueros problema. Los resultados se organizaron por bloques (del 1 al 16), la parte superior e inferior de cada bloque corresponden a tiras corridas con el mismo suero y se indica en cada caso si el antígeno viral fue procesado por el método tradicional (con ditionotreitolo) o por el método modificado, retirando el DTT. En cada bloque se encuentran las tiras correspondientes de control (+) y control (-) de esas corridas.

Método tradicional
(con ditiotretol)

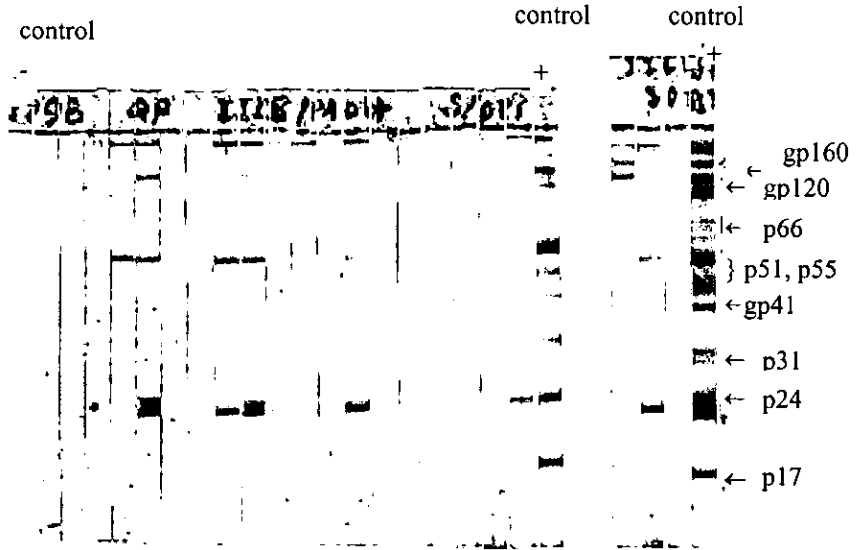
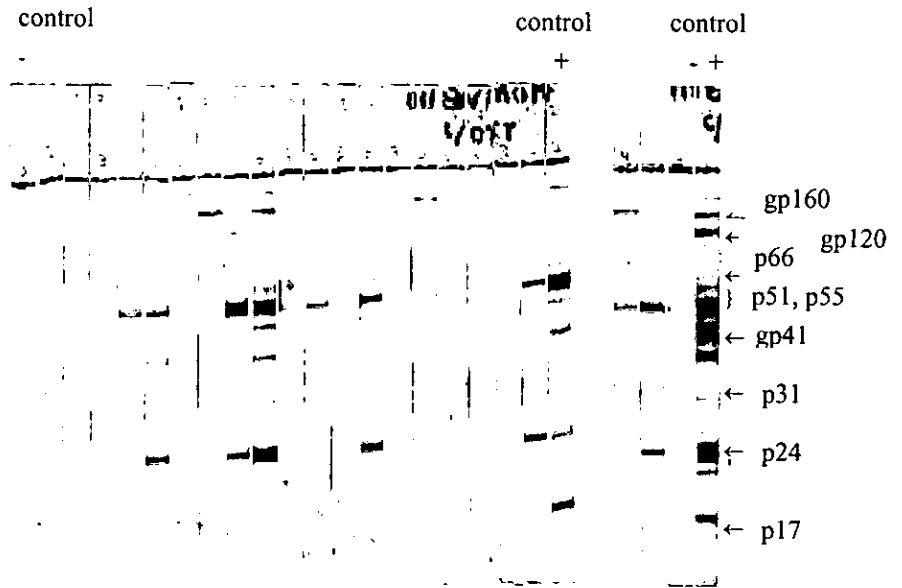


Método modificado
(sin ditiotretol)



Bloque I. Primeras 10 muestras corridas con tiras preparadas por el método tradicional (bloque superior) y por el método modificado (bloque inferior). Los controles + y - están indicados.

Método tradicional
(con ditiotreitól)



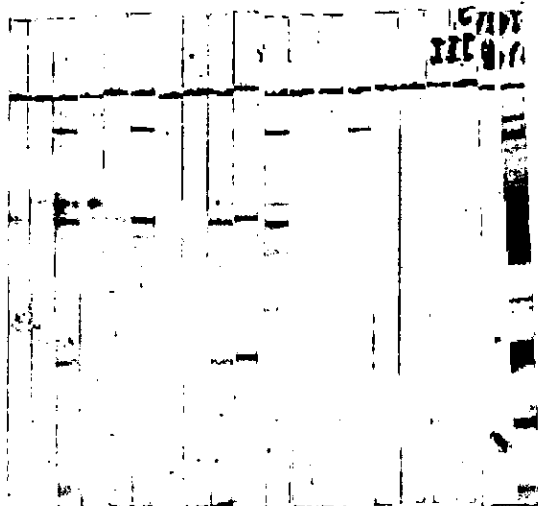
Método modificado
(sin ditiotreitól)

Bloque 2. Muestras de la 11 a la 30 . Los controles
están indicados.

Método tradicional
(con ditiotreitol)

control

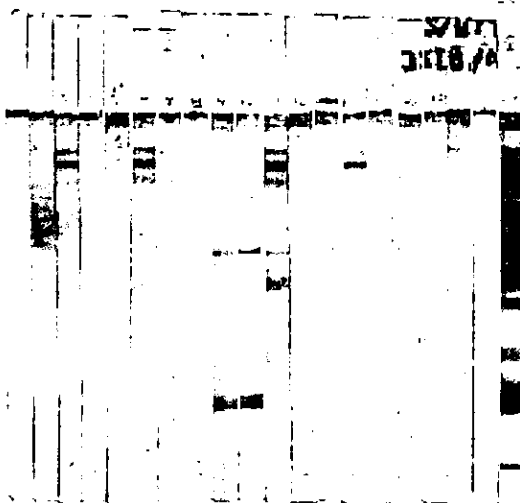
- +



Método modificado
(sin ditiotreitol)

control

- +

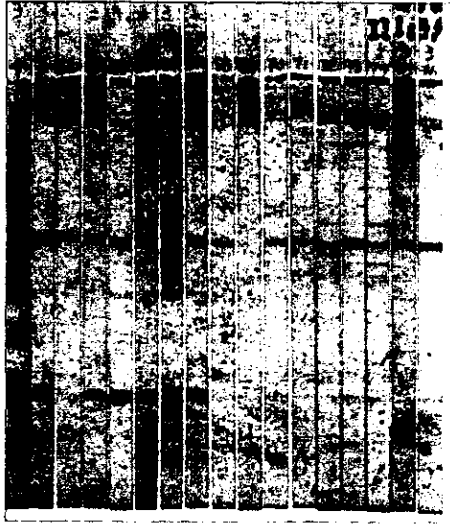


Bloque 3. Muestras 31 hasta 48. Los controles
están indicados

Método tradicional
(con ditiotreitol)

control

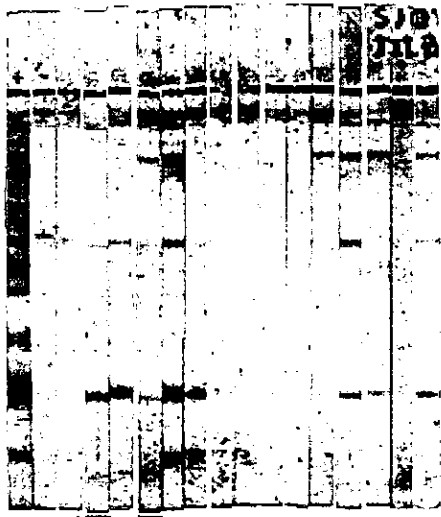
+ -



Método modificado
(sin ditiotreitol)

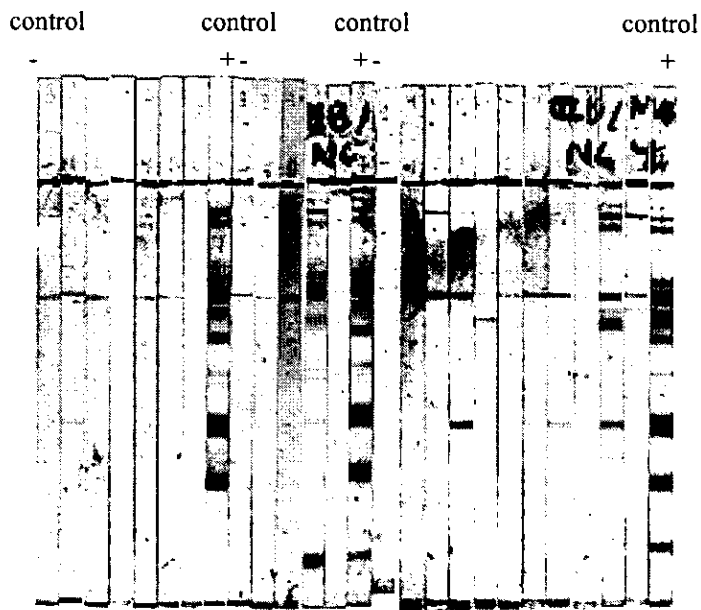
control

+ -

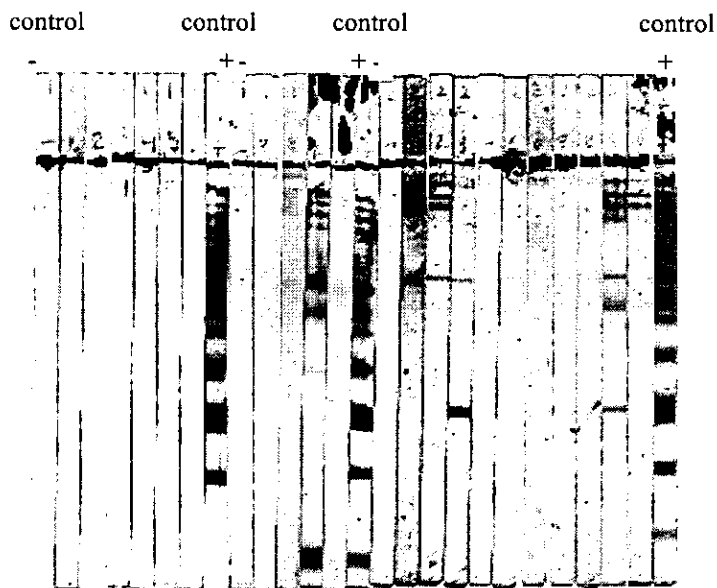


Bloque 5. Muestras 64-78. Los controles están indicados

Método tradicional
(con ditiotreitol)

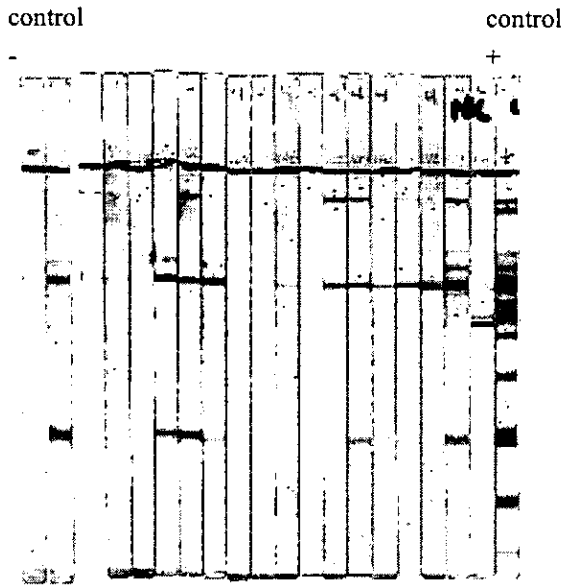


Método modificado
(sin ditiotreitol)

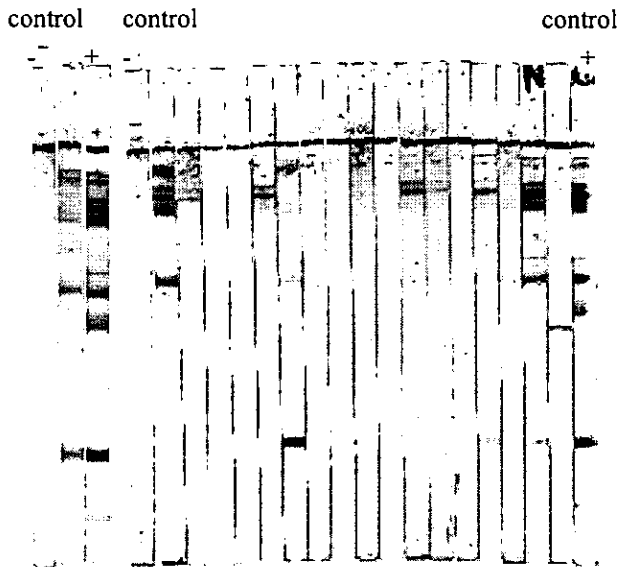


Bloque 6. Muestras 79-98. Los controles están indicados.

Método tradicional
(con ditiotreitol)

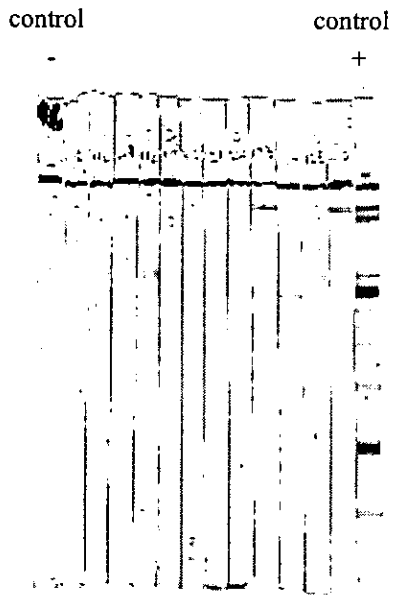


Método modificado
(sin ditiotreitol)

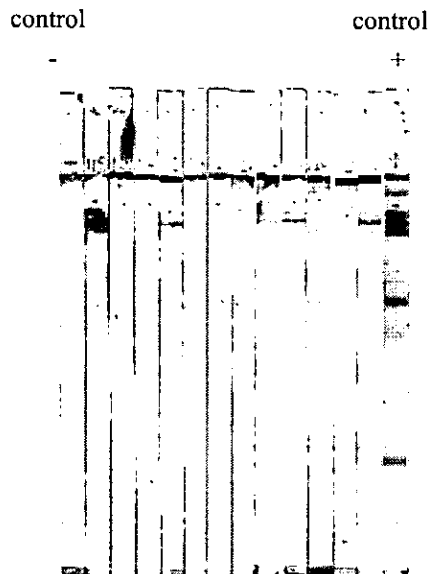


Bloque 7. Muestras 99-116. Los controles están indicados

Método tradicional
(con ditioneitol)



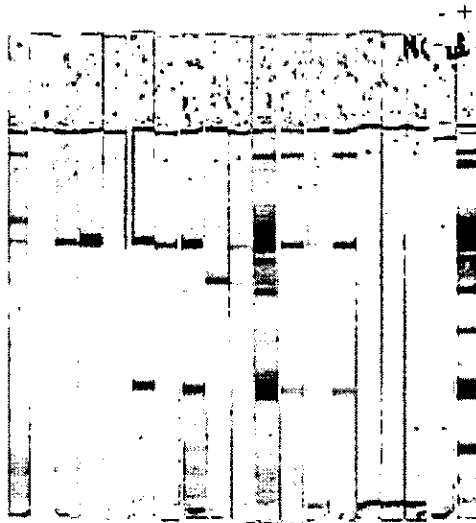
Método modificado
(sin ditioneitol)



Bloque 8. Muestras 117-128. Los controles están indicados

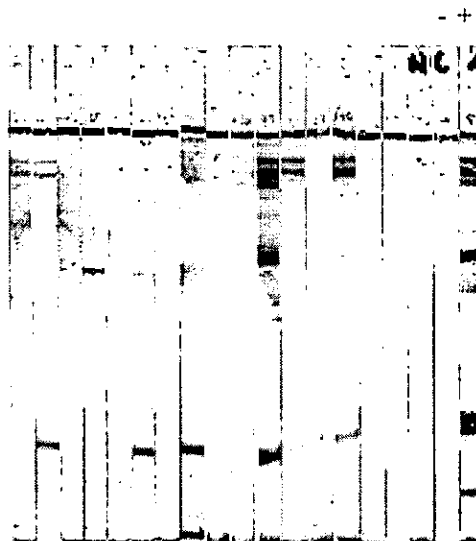
Método tradicional
(con ditiotreitol)

control



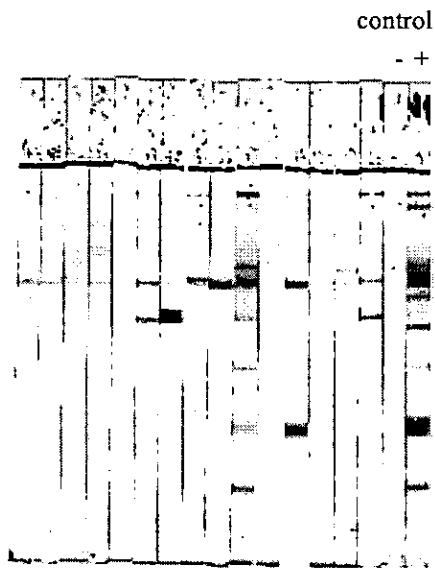
Método modificado
(sin ditiotreitol)

control

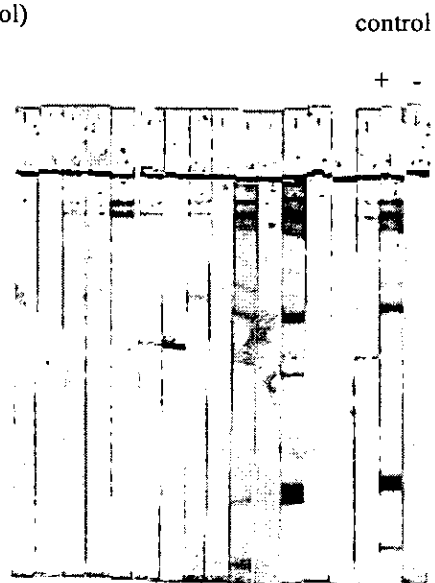


Bloque 9. Muestras 129-145. Los controles
están indicados

Método tradicional
(con ditiotreitól)

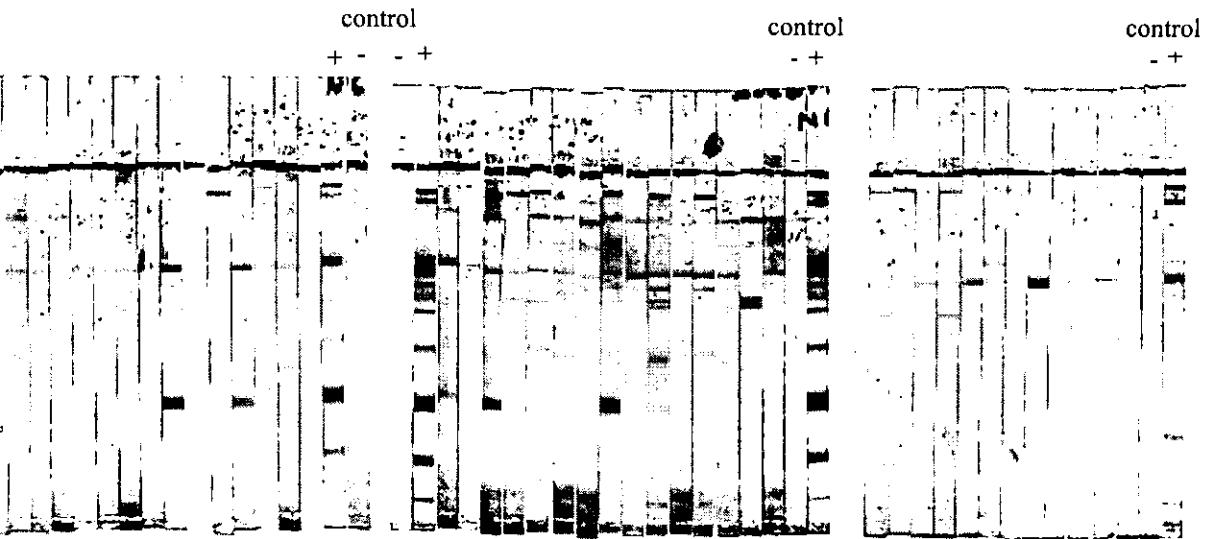


Método modificado
(sin ditiotreitól)

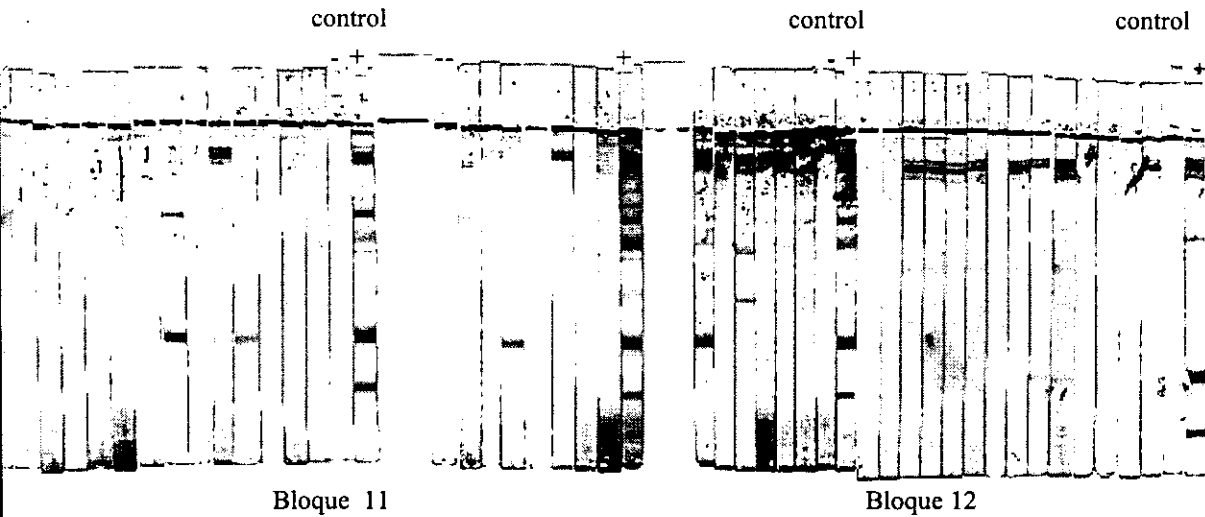


Bloque 10. Muestras 146-160. Los controles están indicados

Método tradicional
(con ditiotreitol)



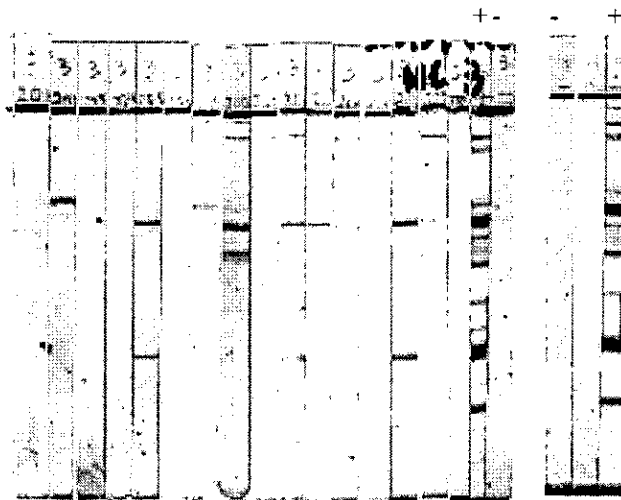
Método modificado
(sin ditiotreitol)



Se indican en ambos bloques las muestras 161-202.
Los controles están señalados

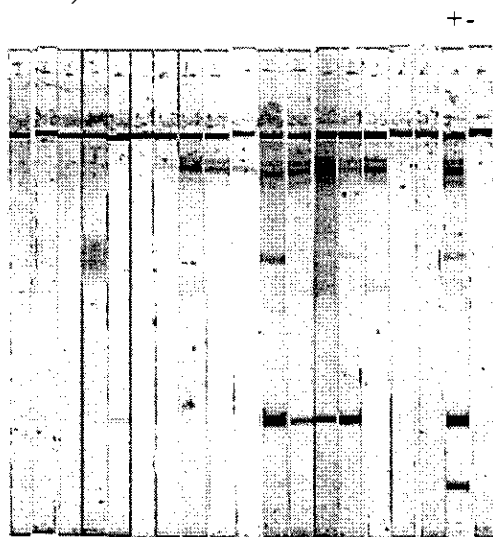
Método tradicional
(con ditiotreitol)

control



Método modificado
(sin ditiotreitol)

control

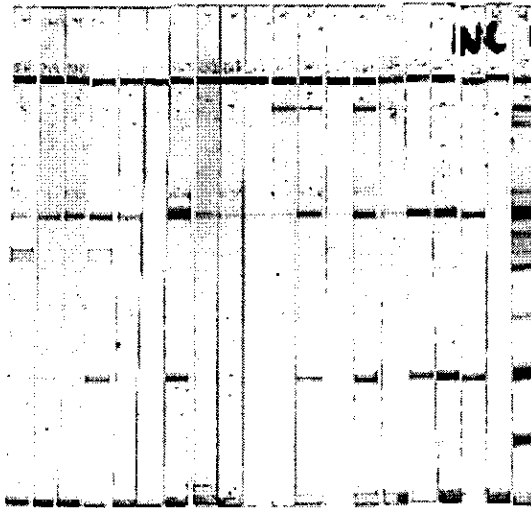


Bloque 13. Muestras 203-218. Los controles están indicados.

Método tradicional
(con ditiotreitol)

control

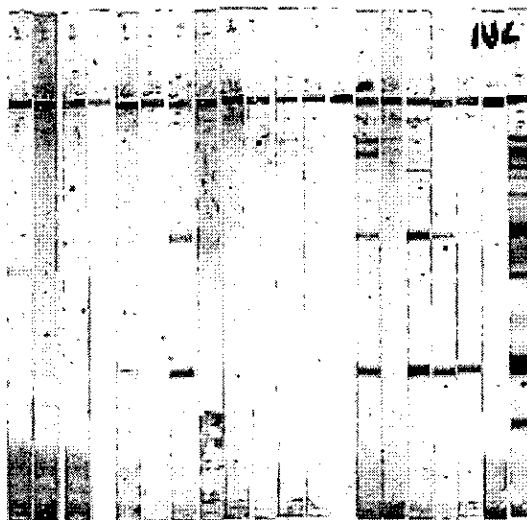
- +



Método modificado
(sin ditiotreitol)

control

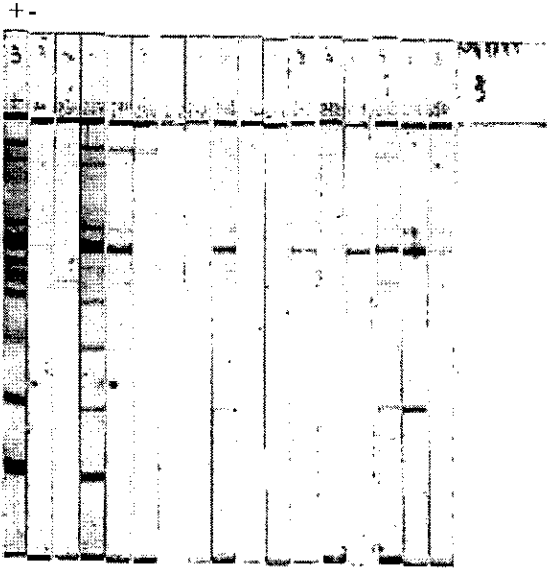
- +



.Bloque 14. Muestras 219-236. Los controles están indicados.

Método tradicional
(con ditiotretitol)

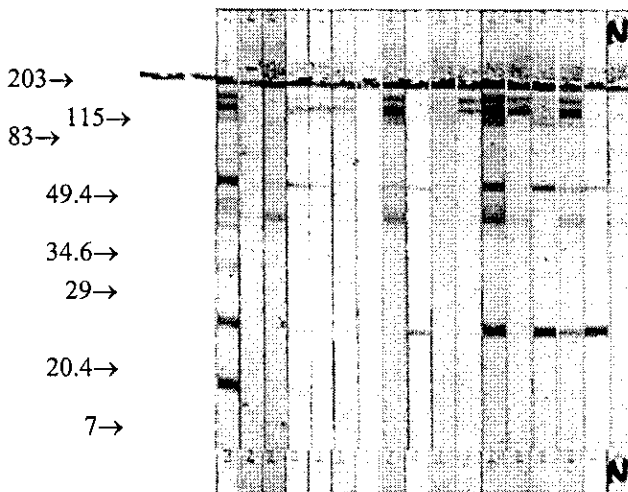
control



Marcador de pesos
moleculares ($\times 10^3$ Kd)

Método modificado
(sin ditiotretitol)

control

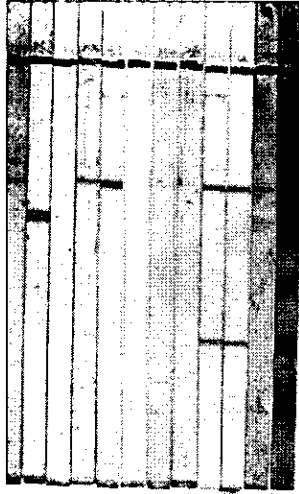


Bloque 15. Muestras 237-251. Los controles
están indicados

Método tradicional
(con ditiotreitól)

control

- +



Método modificado
(sin ditiotreitól)

control

- +



Bloque 16. Muestras 252-260. Los controles están indicados.

En la tabla 1 se indica el número de muestras que presentan reactividad con las proteínas indicadas, se puede observar que cambia la frecuencia de detección de algunas proteínas. Al comparar el WB sin DTT con el WB tradicional con DTT p17, p31, p51, p55 y p66 disminuyen, mientras que p24, gp41, gp120 y gp160 aumentan en frecuencia de detección.

Bandas virales	Frecuencia	
	Sueros en el WB con DTT	Sueros en el WB sin DTT
p17	25	3
p24	100	105
p31	21	11
gp41	11	42
p51	244	110
p55	9	2
p66	48	8
gp120	4	100
gp160	95	99

Tabla 1. Frecuencia de aparición de las proteínas virales en los Western blots efectuados simultáneamente con cada uno de los sueros problema. Uno utiliza como antígeno a proteínas del virus tratadas con ditiotreitól (DTT) (Método tradicional) y el otro, usa proteínas virales no tratadas con DTT (Método modificado).

La figura 1 muestra gráficamente los resultados anteriores. Son importantes los resultados con dos de las glicoproteínas, gp41 y gp120, en las que se observa un mayor reconocimiento por los sueros cuando no se desnaturalizan completamente las proteínas respectivas. La importancia de este hallazgo radica en que la reactividad a estas proteínas se considera como marcador diagnóstico.

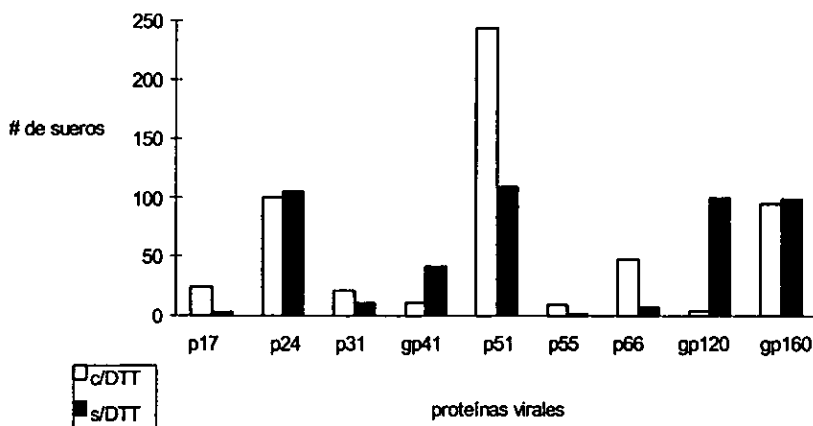


Figura 1. Resultados comparativos de reactividad a las diferentes proteínas del VIH con el Western blot tradicional (c/DTT) y el Western blot modificado (s/DTT).

En la literatura se reportan diferentes criterios de interpretación para un WB. Los más empleados (en la tabla 1 de la introducción se indican los criterios empleados en cada caso) son: CDC, CRSS, Cruz Roja, FDA y OMS. En nuestro estudio se interpretaron las tiras pareadas corridas con cada suero con cada uno de estos criterios de interpretación, datos que se presentan en la tabla 2.

INSTITUCION	WB tradicional			WB modificado		
	(+)	(-)	(IND)	(+)	(-)	(IND)
CDC/USA	48	10	202	99	97	64
CRSS	49	10	201	55	97	108
CR/USA	47	10	203	43	97	120
FDA	9	10	241	4	97	159
OMS	11	10	239	94	97	69

Tabla 2

La primera observación es que con el WB modificado disminuye considerablemente el número de resultados indeterminados independientemente del criterio de interpretación utilizado. También puede observarse que aplicando los criterios de CR/USA y de FDA el número de muestras asignadas como positivas con el WB modificado disminuye de 47 a 43 y de 9 a 4 respectivamente. Sin embargo, aplicando los criterios de las otras 3 instituciones: CDC/USA, CRSS y OMS se detecta un mayor número de muestras confirmadas positivas empleando el WB modificado. El número comparativo de muestras que resultan positivas es bastante significativo sobre todo utilizando la interpretación de los CDC/USA 48 a 99 y de la OMS 11 a 94. Por otra parte, resulta interesante el análisis de los resultados negativos, el cual, utilizando cualquiera de los criterios de interpretación empleados, presenta 10 muestras negativas con el WB tradicional, mientras que con el WB modificado en todos los casos se encuentran 97 muestras negativas.

En la tabla 3 se presentan los resultados del análisis muestra por muestra, indicándose el número de sueros que resultaron equivalentes al aplicar cualquiera de los WB; el número de muestras resueltas como positivas y negativas únicamente en el WB tradicional; el número de muestras que se resolvieron tanto positiva como negativamente con el empleo del WB modificado y, en la última columna, el número total de sueros analizados con los criterios de cada una de las instituciones.

INSTITUCION	Muestras con resultado equivalente en ambos WB			Muestras obtenidas como + o - solo en el WB tradicional		Muestras resueltas como + o - solo en el WB modificado		Total
	(+)	(-)	(IND)	(+)	(-)	(+)	(-)	
CDC/USA	48	9	63	0	1	51	88	260
CRSS	39	9	97	10	1	16	88	260
CR/USA	29	9	101	18	1	14	88	260
FDA	2	9	151	7	1	2	88	260
OMS	11	9	68	0	1	83	88	260

Tabla 3

Haciendo un análisis comparativo entre los 2 WB empleados se observa que en el criterio de la OMS empleando el WB modificado 171 de 239 sueros que eran indeterminados se resuelven, ya sea como + o como -, también es muy importante el número de muestras de las cuales se puede dar un diagnóstico definitivo en el caso del empleo del criterio de CDC/USA, en que se resuelven 139 de 202 muestras. Obsérvese que empleando los criterios de todas las instituciones se obtiene solo una muestra con resultado negativo únicamente en el WB tradicional y ninguna con resultado positivo con los criterios del CDC y de la OMS.

5. DISCUSION

Los anticuerpos que se producen ante la exposición a un agente infeccioso están dirigidos contra una variedad de epitopos, entre los cuáles se encuentran algunos formados por estructuras conformacionales de las proteínas que constituyen a dicho agente.

El WB que regularmente se emplea para confirmar la presencia de anticuerpos anti-VIH en un suero contiene proteínas virales separadas en presencia de SDS, tritón X-100, deoxicolato de sodio y ditiotreitól (DTT), lo cuál permite detectar primordialmente anticuerpos dirigidos contra epitopos lineales. Se ha observado a lo largo del tiempo que un número no despreciable de individuos dan un resultado indeterminado al emplear este tipo de WB. Existe una amplia bibliografía al respecto de autores que reportan reactividad a varias proteínas virales en personas no infectadas. Povolotsky *et al* reportaron que la banda viral que se presenta más comúnmente en resultados indeterminados de WB es p24, intentaron diferenciarla de aquella detectada en pacientes verdaderamente infectados aplicando un ELISA de inhibición que provocó su disminución en personas no infectadas y no alteró la de los individuos infectados.⁽²⁴⁾ Healey y Bolton, utilizando WB comerciales, obtuvieron reactividad a la glicoproteína viral gp41 en 13 personas no infectadas y sin conductas de alto riesgo a la infección con el VIH.⁽²⁵⁾ Baskar *et al* recientemente demostraron que individuos convalecientes de una infección con el virus del sarampión, así como sueros anti-HLA provenientes de un grupo de mujeres con antecedentes de embarazos previos, presentaron reactividad indeterminada en un WB por poseer anticuerpos que reaccionaron cruzadamente con algunas proteínas del VIH, principalmente p17, p24, gp41 y p55.⁽²⁶⁾ Por otra parte, Sayre *et al* demostraron incluso que 4 individuos no infectados podrían ser diagnosticados como falsos positivos por haber presentado reactividad no específica contra 2 glicoproteínas de la envoltura: gp41 y gp160, así como contra p24, en un WB comercial. Sugirieron ser cuidadosos en la interpretación de los resultados del WB y observar que una banda nítida que puede aparecer justo arriba de gp41 no debe ser confundida con la banda difusa de gp41, que va a visualizarse siempre después de gp120 y gp160.^(27,28)

Para intentar resolver nuestros resultados indeterminados se estudio el efecto de modificar las condiciones de desnaturalización de las proteínas del VIH. El ditiotreitól o el 2-mercaptoetanol contribuyen a romper los puentes disulfuro que unen regiones de una misma proteína ó subunidades proteicas. Por esta razón se produjeron tiras de WB sin la presencia de DTT.

Se estudiaron un total de 260 sueros diagnosticados previamente como indeterminados con el WB tradicional. Se corrieron en paralelo en tiras preparadas de la manera tradicional y en tiras preparadas sin ditiotreitól.

Si analizamos los datos de cuáles proteínas virales se reconocen mejor o no se reconocen con cada uno de los WB empleados, resalta que las proteínas más significativas para determinar la positividad de una muestra, por ejemplo: gp41, gp120 y gp160 se detectan más claramente al no desnaturalizar completamente el antígeno viral, lo cual nos indica que posiblemente epitopos claves en su reconocimiento pueden ser de tipo conformacional. A su vez, las proteínas menos específicas en el WB como p17, p51, p55, p66 son menos reconocidas en el WB modificado, lo cual podría interpretarse como que en su forma lineal estas proteínas podrían contener secuencias de aminoácidos que reaccionan cruzadamente con anticuerpos inducidos hacia otros antígenos. Desde 1991 Race *et al* demostraron que 4 individuos seronegativos infectados con el VIH, sí poseían anticuerpos contra el virus en sus muestras de suero, sin embargo, éstos reconocían únicamente epitopos conformacionales de la glicoproteína viral gp160. La detección la lograron utilizando un ensayo serológico no desnaturalizante de inmunofluorescencia de células vivas infectadas.⁽²⁹⁾ Gaines y col. encontraron que en individuos con sintomatología de infección primaria con el VIH, los anticuerpos a p24 y gp160 son los más prevalentes, y son detectados después de un periodo de viremia. Estos resultados los motivó a sugerir el uso de ensayos que contengan a esas proteínas como antígenos virales para obtener la más pronta evidencia de una respuesta de anticuerpos en la infección primaria con el virus.⁽³⁰⁾ Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Moore y col. en 1994 cuando establecieron que la respuesta de anticuerpos contra gp120 en individuos seroconvertidores esta dirigida a epitopos conformacionales.^(31,32) Otros resultados coincidentes con la hipótesis de que los anticuerpos conformacionales juegan un papel clave en el diagnóstico de la infección son los obtenidos con los ensayos de radioinmunoprecipitación (RIPA), con los que se detecta más frecuentemente a las glicoproteínas de la envoltura: gp120 y gp160.^(33,34)

Existe un número no despreciable de sueros que aplicando un estricto apego a cada uno de los criterios propuestos por el CDC/USA, CRSS y la CR/USA, fueron obtenidos con resultados positivos en el WB tradicional, aunque no fueron diagnosticados positivos debido a que algunos anticuerpos anti-VIH pueden detectarse en personas que no poseen la infección con el virus, en 1992, King *et al* sugirieron que la reactividad inicial contra algunas proteínas virales, en particular a las glicoproteínas gp120 y gp160, puede predecir el proceso de seroconversión.⁽³⁵⁾

Al aplicar el WB modificado se resuelven gran parte de los resultados indeterminados obtenidos en el WB tradicional. El número varía de acuerdo al criterio de interpretación empleado, así al utilizar el criterio de la OMS se diagnostican 170 de 239 resultados indeterminados, resolviéndose 83 como positivas y 87 como negativas. Aplicando el criterio de los CDC de Estados Unidos se resuelven 138 muestras indeterminadas, 51 como positivas y 87 como negativas. Con los otros 3 criterios también se resuelven un número considerable de estos resultados indeterminados: 82 por FDA; 93 por CRSS y 83 por la Cruz Roja americana. El mínimo de muestras indeterminadas resueltas fue de 37% con el criterio de FDA y el máximo de 71% con el criterio OMS.

6. CONCLUSIONES

- 1.- Logramos demostrar la detección de anticuerpos que reconocen primordialmente epitopos conformacionales de algunas proteínas del VIH en un Western blot modificado, lo que nos permite afirmar que la hipótesis del trabajo fue verdadera para todas las muestras que resultaron positivas empleando los diferentes criterios de interpretación.
- 2.- Resolvimos los diagnósticos indeterminados ya sea como positivos o negativos, entre un 37 y hasta un 71%, empleando los criterios de la FDA y de la OMS, respectivamente.
- 3.- Muy notablemente, el WB modificado disminuyó la reactividad a la proteína viral p51, la cuál alcanzó frecuencias de detección similares a las de p24, gp120 y gp160, Esto podría decirnos que el WB modificado eliminó el 45% de los resultados falsos positivos que pueden encontrarse contra p51 en el WB tradicional.
- 4.- La aplicación del WB modificado no alteró la frecuencia de detección que ya había sido observada en el WB tradicional contra proteínas que son consideradas por la OMS y por los CDC como "clave" en el diagnóstico confirmatorio de la infección con el VIH. Lo que nos motiva a sugerir que puede sustituirlo sin ningún inconveniente para poder obtener un mejor diagnóstico.
- 5.- Finalmente, con nuestros resultados demostramos lo que otros autores ya habían sugerido: que la detección de alguna de las glicoproteínas de la envoltura del VIH (comúnmente gp120 ó gp160) puede utilizarse como valor predictivo de seroconversión, pues, encontramos que en las muestras de suero con anticuerpos únicamente a p24 y gp160 en el WB tradicional, se detectaron también anticuerpos a gp120 por el WB modificado, con ese patrón de bandas alcanzado, incluso pueden diagnosticarse ya como positivas por los criterios de la OMS y de los CDC americanos.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1.-Shoub, B.D. 1994. AIDS & HIV IN PERSPECTIVE A Guide to Understanding the virus and its Consequences; Cambridge University Press, p. 1-4.
- 2.-Stott, E.J. & Schild, G.C. 1994. Synthetic Vaccines, Nicholson , B.H. (Ed.); Blackwell Scientific Publications, Oxford London, p 453.
- 3.-La epidemia de SIDA : situación en diciembre de 1998. ONUSIDA/OMS.
- 4.-Revista SIDA/ETS. SSA. CONASIDA. 1998. 4(2).
- 5.-Guía para una correcta comprensión y manejo de la infección por VIH. ESPAÑA: Fundación anti-sida españa (FASE). 1997: 59.
- 6.-Constantine, N.T. *et al.* 1992. **Retroviral testing** Essentials for Quality Control and Laboratory Diagnosis; CRC press, Boca Ratón Florida, p15-18,37-42.
- 7.-Collier, L. and Oxford J. 1993. Human Virology;Oxford University Press, London, p 282-283.
- 8.-Coffin, J.M. 1990. Virology, Bernard N. Fields *et al* (Eds.), Raven Press, Second Edition, New York, p 1437-1440.
- 9.-Abbas, A.K. *et al.* 1991. Cellular and Molecular Immunology; W. B. Saunders Company; Philadelphia, p386.
- 10.-O'Brien, W.A. and Pomerantz, R.J. 1997. Viral Pathogenesis, Neal Nathanson, *et al* (Eds), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p815.
- 11.-Levy, J.A. 1998; HIV and the Pathogenesis of AIDS; American Society for Microbiology Press, Second Edition, Washington, D.C.,p7-9,43,52,84.
- 12.-Connor, R. I.and Ho, D.D. 1992. AIDS Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention, Vincent T. Devita, Jr. *et al* (Eds.); J.B.Lippincott Company; Philadelphia, p13-18.
- 13.-Ratner, L. 1996. Immunology of HIV infection, Sudhir Gupta (Ed.); Plenum Publishing Corporation, New York, p3-7.
- 14.-White, D.D.and Fenner, F.J. 1994. Medical Virology; Academic press, inc.,Fourth Edition, San Diego California, p544-547.
- 15.-Calva Mercado, Juan *et al.* 1997. Guía para la atención médica de pacientes con infección por el VIH/SIDA en consulta externa y hospitales, México: CONASIDA
- 16.-Midhun, K *et al.* 1990. Frequency of Indeterminate Western Blot Test in Healthy Adults at Low Risk for Human Immunodeficiency Virus Infection. The Journal of Infectious Diseases; 162: 1379-1382.

- 17.-Moore, J. P., *et al.* 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to the envelope glycoproteins of divergent strains of HIV-1. *AIDS*; 3: 155-163.
- 18.-Celum, C. L., *et al.* 1991. Indeterminate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Western Blots: Seroconversion Risk, Specificity of Supplemental Test, and an Algorithm for Evaluation. *The Journal of Infectious Diseases*; 164: 656-64.
- 19.-Saah, A. J., *et al.* 1987. Detection of Early Antibodies in Human Immunodeficiency Virus Infection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Western blot, and Radioimmunoprecipitation. *Journal of Clinical Microbiology*; 25(9): 1605-1610.
- 20.-Zaaijer, H. L., *et al.* 1992. Early detection of antibodies to HIV by third-generation assays. *The Lancet*; 340: 770-72.
- 21.-Simon, F, *et al.* 1992. Reliability of western blotting for the confirmation of HIV-1 seroconversion. *The Lancet*; 340: 1541-1542.
- 22.-Nair, B. C., *et al.* 1994. Enzyme Immunoassay Using Native Envelope Glycoprotein (gp160) for Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*; 32(6): 1449-1456.
- 23.-Zaaijer, H. L., *et al.* 1997. New anti-human immunodeficiency virus immunoblot assays resolve nonspecific Western blot results. *Transfusion*; 37: 193-198.
- 24.-Povolotsky, J. *et al.* 1991. Differences in Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Anti-p24 Reactivities in Serum of HIV-1-Infected and Uninfected Subjects: Analysis of Indeterminate Western Blot Reactions. *The journal of infectious Diseases*; 163: 247-251.
- 25.-Healey D. S. and Bolton W. V. 1993. Apparent HIV-1 glycoprotein reactivity on Western blot in uninfected blood donors. *AIDS*; 7: 655-658.
- 26.-Baskar, P. V., *et al.* 1998. Serum Antibodies to HIV are produced post-measles virus infection: evidence for cross-reactivity with HLA. *Clin. Exp. Immunol.*; 111:251-256.
- 27.-Sayre, K. R. *et al.* 1996. False-positive human immunodeficiency virus type 1 Western blot test in noninfected blood donors. *Transfusion*; 36: 45-52.
- 28.-Fenouillet, E. *et al.* 1991. gp160 of commercial HIV Western blots is not gp160^{env}. Should criteria for seropositivity be revised?. *AIDS*. 5(6):770.
- 29.-Race, E. M., *et al.* 1991. Human Immunodeficiency Virus Infection Elicits Early Antibody Not Detected by Standard Test: Implications for Diagnostics and Viral Immunology. *Virology*; 184: 716-722.
- 30.-Gaines, H. *et al.* 1987. Antibody Response in Primary Human Immunodeficiency Virus Infection. *The Lancet*; 1249-1253.

31.-Moore, J. P., *et al.* 1994. Development of the Anti-gp120 Antibody Response during Seroconversion to Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*; 68(8): 5142-5155.

32.-D'souza, M. P. and Mathieson, B. J. 1996. Early Phases of HIV Type 1 Infection. *Aids Research and Human Retroviruses*; 12(1): 1-9.

33.-Pierre Allain, J. *et al.* 1986. Serological Markers in Early Stages of Human Immunodeficiency Virus Infection in Haemophiliacs. *The Lancet*; 1233-1236.

34.-Kitchen, L. *et al.* 1986. Viral Envelope Protein of HTLV-III is the Major Target Antigen for Antibodies in Hemophilic Patients. *The journal of Infectious diseases*; 153(4): 788-790.

35.-King. R. *et al.* 1993. The presence or absence of gp120/gp160 bands on indeterminate Western blots: predictive value for HIV seroconversion. *AIDS*; 7(3): 437-438.