



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**EVALUACIÓN DE LA CONFIABILIDAD DIAGNÓSTICA DEL
MÉTODO DE ESCRUTINIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIH
COMPARÁNDOLO CON EL WESTERN BLOT**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

ABEL ALEJANDRO URBANO PALAFOX

**DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. BRENDA MARISOL RODRÍGUEZ
ALVARADO**

**ASESOR DE TESIS: DRA. MARTHA ASUNCIÓN SANCHEZ
RODRÍGUEZ**



MÉXICO, D.F. 27 DE NOVIEMBRE DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

“La mente rechaza una nueva idea con la misma fuerza que el cuerpo rechaza una proteína que le es extraña y se resiste a ella con similar energía. Quizás no sería descabellado decir que una idea nueva es el antígeno de más rápido efecto que conoce la ciencia. Si nos observamos con sinceridad descubriremos que con frecuencia hemos empezado a atacar una nueva idea antes de que haya terminado de ser formulada”.

Wilfred Batten Lewis Trotter



Agradecimientos

De manera muy especial agradezco al Laboratorio CARPERMOR por haber hecho posible la realización y culminación del proyecto de tesis, en especial a la Q.F.B. Brenda Marisol Rodríguez Alvarado directora de este proyecto, por su confianza, apoyo y orientación durante este año.

También quiero agradecer a la Q.F.B. Luz Elena Alcántara Gómez por abrir las puertas de esta institución, ya que sin su autorización y consentimiento este proyecto nunca se habría realizado.

Muchas gracias.

Agradezco a Dios

Por haberme permitido llegar a la culminación de una etapa de mi vida y más aún por haber puesto en mi camino a cada una de las personas que ayudaron en la obtención de este logro.

Agradezco a Mamá y Papá

Porque además de darme la vida, me brindaron todo su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, son mis mejores maestros ya que he aprendido muchas lecciones y espero seguir aprendiendo más de ustedes mientras Dios nos lo permita. Gracias por todos sus consejos y por su ejemplo de vida.

Agradezco a mi Hermano

Por estar conmigo cuando necesite una orientación para poder escoger una carrera, cuando tuve el infortunio de mi pie estuviste ahí. Gracias por ser el mejor hermano. Dios te proteja a ti y a toda tu familia.

Agradezco a Anel

Por ser una parte importante de mi vida, por el apoyo, paciencia y motivación que me diste durante la carrera, sin ti no estoy muy seguro de haber llegado a estas instancias. Gracias por estar conmigo y ser lo mejor que me ha pasado en la vida. TANLO.

Agradezco a mi Familia

Ya que parte fundamental de mi desarrollo como individuo y de mi carácter se lo debo a mi abuela María de la Paz García Bucio. Los cuidados y cariños así como su preocupación que a lo largo de mi vida he recibido de mis dos tías Sandra y Lupita, los consejos recibidos por mi tío Rafael.

También agradezco a mi prima Diana que sin su apoyo la elaboración de este trabajo escrito hubiera sido un poco más complicado, su hermano Minoru con quien he convivido muchos momentos alegres. Gracias.

Agradezco a mis Sinodales

Por haber dedicado su tiempo, tal vez de estar con su familia o día de descanso para revisar este proyecto. Q.F.B Francisco Javier Parada García, Dra. Martha Asunción Sánchez Rodríguez, Q.F.B. María del Pilar Cedillo Martínez, Q.F.B. Pablo Juárez de los Santos. Gracias.

Agradezco a mis profesores

Por todas sus enseñanzas, consejos, dedicación a su trabajo, su tiempo, la amistad con la que más de uno pude tener. Mi reconocimiento y gratitud en especial a tres maestras por su apoyo y confianza en mí; Q.F.B. Enriqueta Castrejón Rodríguez, Q.F.B Patricia Vidal Millán, Dra. Martha Asunción Sánchez Rodríguez. Gracias

También agradezco al Q. Carlos Salvador Valadez Sánchez por haberme dado la mejor lección dentro de un salón de clases Gracias.

Agradezco a mis Amigos

Por todos los excelentes momentos que pase con cada uno de ellos en lo individual y lo colectivo; Karina, Israel (Negro), Daniel (Toby) mención honorífica ya que cuando más necesite un amigo siempre estuviste presente, Vinicio (Moy), Emanuel, Rodrigo, Alonso, Miguel, Javier, Jazmín y Lucia. Gracias por que también tuve el honor de conocer a sus familias.

Dedicatoria

Dedico esta tesis y examen profesional a Mamá (Leonila) y Papá (Rubén) por su esfuerzo, empeño, dedicación y amor por su familia dando lo mejor de sí para sus hijos (Ivan y Abel), siempre siendo un buen ejemplo de trabajo y constancia.

Para Anel por todo el apoyo durante la carrera y que estamos muy pronto a cumplir una de nuestras principales metas que nos permitirán seguir adelante.

También está dedicado este trabajo a Dany que espero poder verlo muy pronto por azares del destino nos encontramos distanciados.

Finalmente la dedico a Rodrigo (Q.E.P.D.) me encantaría que estuvieras aquí pequeño, pero sé que donde ahora te encuentras estas mejor, lejos de las inmundicias de este mundo. Sé que algún día nos volveremos a ver, mientras, cuida de mí.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	4
3.1 Generalidades del VIH	4
3.2 Estructura	4
3.3 Genoma del VIH	5
3.4 Función de las proteínas víricas	6
3.5 Entrada en la célula y replicación	9
3.6 Variabilidad y distribución geográfica del VIH	12
3.7 Cifras oficiales en México	15
3.8 Diagnóstico	17
3.8.1 Enzimoimmunoanálisis	18
3.8.2 Aglutinación	19
3.8.3 Pruebas de EIA de membrana (Dot-Blot)	19
3.8.4 Inmunoensayo por micropartículas (MEIA)	19
3.8.5 Inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (CMIA)	19
3.9 Quimioluminiscencia	20
3.10 Western blot	21
3.11 Estudios diagnósticos	25
3.12 Sensibilidad y especificidad	26
3.13 Relación entre sensibilidad y especificidad	28
3.14 Curvas de características operativas del receptor (COR)	28
4. Planteamiento del problema	29

5. Objetivos	30
5.1 General	30
5.2 Específicos	30
6. Hipótesis	31
7. Métodos	32
7.1 Diseño de estudio	32
7.2 Población	32
7.3 Criterios de inclusión	32
7.4 Criterios de exclusión	32
8. Procedimiento	33
8.1 Reconstrucción de los reactivos	33
8.2 Método ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo	33
8.3 Método Western blot (NEW LAV BLOT)	34
8.4 Evaluación de los resultados	35
9. Análisis estadístico	36
10. Diagrama de flujo	37
11. Resultados	38
12. Discusión de los resultados	53
13. Conclusión	57
14. Referencias	58

1. RESUMEN

Antecedentes: El reporte de falsos positivos y negativos en el diagnóstico del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es relativamente frecuente debido a las distintas fases de la infección, estados de inmunosupresión, infecciones por virus como hepatitis C (VHC) o cruce con anticuerpos heterofilos, entre otros. El inmunoensayo magnético quimioluminiscente (CMIA) que detecta anticuerpos para VIH-1/2 y antígeno p24 del VIH en suero humano es una técnica que se piensa puede evitar o disminuir el reporte de estos resultados falsos, pero es necesario evaluar si el punto de corte empleado es el correcto o si se puede realizar alguna mejoría que contribuya al beneficio del paciente.

Objetivo: Determinar la correlación entre el CMIA y el Western blot para VIH1 en sueros humanos, así como el índice de falsos negativos y posibles cruces antigénicos.

Métodos: Se recolectaron 500 muestras de sueros de pacientes del Laboratorio de Referencia Internacional CARPERMOR que fueron procesadas por el método CMIA para detección del antígeno p24 y anticuerpos VIH1 y VIH2, y el Western blot I para VIH. Se calcularon los parámetros de sensibilidad, especificidad, valores predictivos, índices de falsos y valores de corte a través de curvas COR.

Resultados: Se encontraron 276 (55%) muestras positivas a VIH y 109 (22%) indeterminadas, con una sensibilidad del 100%, especificidad de 93% e índice de falsos positivo de 7% para el CMIA. Analizando por proteína, se observó que la sensibilidad varía entre el 73 y 90% y la especificidad entre 82 y 100%, siendo la proteína p24/25 la que presentó el mayor índice de falsos positivos (18%). El valor de corte para la mayoría de las proteínas fue mayor a 11 S/CO y los indeterminados en general presentaron sólo 1 banda en el Western blot.

Conclusión: El método CMIA es confiable para el diagnóstico de VIH, aunque hay cruces antigénicos con las proteínas p55, p24/25 y p17/18.

2. INTRODUCCIÓN

En junio de 1981 el Centro para el Control de Enfermedades (CDC sus siglas en inglés) de los Estados Unidos anuncio el incremento en la frecuencia del diagnóstico de dos enfermedades poco comunes como la pulmonía por *Pneumocystis carinii* y sarcoma de Kaposi, en varones jóvenes homosexuales antes sanos. Se comenzaba a presentar una nueva enfermedad que destruía el sistema inmune y en 1983 se sugirió que en la causalidad de esta nueva enfermedad estaba implicado un virus. Finalmente en 1984 se descubrió que el agente causal era un virus que afectaba el sistema inmunológico del organismo.

En México el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) aparece en escena en 1983, los casos notificados de VIH de 1983-2012 fueron de 162,521.

El VIH es un retrovirus el cual contiene ARN, el núcleo es cilíndrico, contiene dos copias de cadena sencilla. Los componentes proteicos del virus son nombrados a partir de su peso molecular, por ejemplo, la proteína que tiene un peso molecular de 32,000 daltones se denomina p32.

El núcleo del virus contiene la transcriptasa reversa (p66 y p55), una endonucleasa (p32), la proteína de la nucleocápside (p9) y una proteasa (p10). El núcleo viral está rodeado por el antígeno principal de la cápside (p24).

La unión del VIH con las células blanco es a través de un receptor. La proteína gp120 de la envoltura del virus específicamente se une con la molécula CD4 sobre la superficie celular. De esta manera, la molécula CD4 actúa como un receptor para el virus.

El diagnóstico de la infección por VIH tiene distintos objetivos como se establece en la NOM-010-SSA-2010: diagnosticar personas que se sospecha puedan estar infectadas y requieren de atención médica, seguridad en las transfusiones, productos hemoderivados y donación de órganos.

Para el diagnóstico del VIH existen diferentes pruebas y se realizan por la detección de anticuerpos contra el virus; existen dos pruebas principales; las que detectan anticuerpos totales llamadas pruebas de tamizaje y las que detectan anticuerpos contra diferentes componentes del virus, que es la que se realiza como prueba confirmatoria llamada Western blot, detección de antígenos virales o aislamiento del virus por cultivo.

Este trabajo evalúa la sensibilidad y especificidad del ensayo ARCHITECT HIV Ag/Ab combo de quimioluminiscencia, comparado con el estándar de oro el Western blot; a su vez se intenta proponer un punto de corte para la quimioluminiscencia en donde la reactividad coincida con el resultado

reactivo (positivo) del Western blot tomando en cuenta el patrón de bandas que aparecen para cada muestra analizada, siguiendo los criterios para la positividad del Western blot establecidos por la OMS.

3. MARCO TEÓRICO

Los virus son estructuras acelulares que no son activos fuera de las células. Si se encuentran en el exterior celular reciben el nombre de viriones. En el interior celular son capaces de controlar la maquinaria metabólica, utilizando para su replicación. Por ello, los virus no se consideran seres vivos.²⁻

4

El primer caso de infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se reportó en 1981; debido a un brote súbito de infecciones oportunistas, neumonía por *Pneumocystis carinii* y sarcoma de Kaposi en tres diferentes hospitales de Los Ángeles, California. Estos fueron reportados como inusuales desde que se había detectado inmunodeficiencia e infección oportunista con citomegalovirus y candidiasis bucal en pacientes aparentemente sanos, la asociación con la pérdida de linfocitos CD4⁺ e inmunosupresión y la probable etiología infecciosa, se asoció con un nuevo retrovirus humano como agente causal.¹

3.1 Generalidades del VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia de los retrovirus Subfamilia Lentivirus, como se mencionó estos virus tienen una serie de características específicas que son determinantes en la compleja patógenia de la infección.⁵

- Gran diversidad genética (virus ARN) y genoma muy complejo (Lentivirus).
- En su ciclo vital hay dos fases: Virión infectante. (ARN) y provirus (ADN). Esta Fase intermedia de integración en el genoma huésped le permite prolongados periodos asintomáticos (latencia), a pesar de una viremia persistente.
- Se replica mediante un mecanismo inverso al habitual de los virus ARN. El papel fundamental lo juega la enzima transcriptasa inversa.
- Sus células huésped son los linfocitos CD4⁺, macrófagos, células nerviosas de la microglía y células dendríticas residentes en mucosa.

3.2 Estructura.

La morfología del VIH de acuerdo con las microfotografías electrónicas es icosaédrica provista de numerosas proyecciones. Presenta una cápside, la cual está cubierta por una membrana de bicapa fosfolipídica que el virus obtiene a partir de la célula hospedera a través del mecanismo de esporulación o escape hacia el medio extracelular. En la superficie de membrana se encuentran embebidas proteínas

estructurales denominadas proteínas de la envoltura (Figura 1). Entre ellas figuran dos glicoproteínas denominadas gp 120 y gp 41.

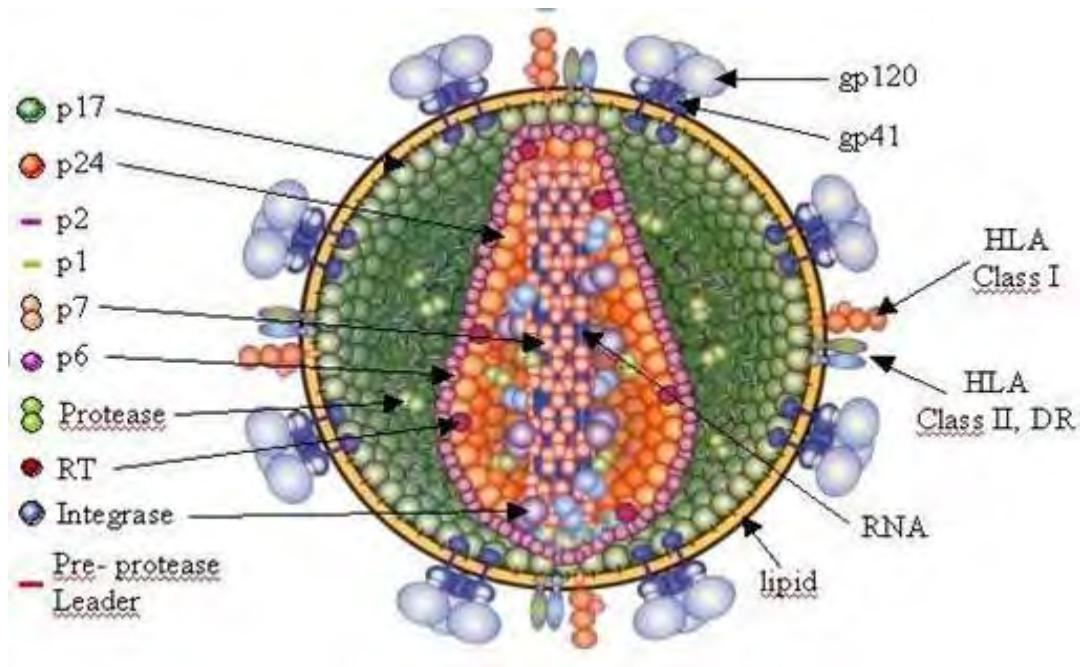


Figura 1. Estructura del VIH-1 o Virus de la Inmunodeficiencia Humana. El virión consta de una capa lípido-proteica y una nucleocápside de forma cónica.⁶

3.3 Genoma del VIH

El genoma del virus comprende dos hebras de ARN de un tamaño aproximado de 9.2-9.7 kilobases (Kb). Está compuesto de tres regiones genéticas: *gag*, *pol* y *env*, también identificados como “*gag*” antígeno específico de grupo, “*pol*”, polimerasa y “*env*” envoltura. La estructura del VIH-1 presenta en la superficie viral glicoproteínas gp120 y 41. Son las responsables en reconocer a los receptores CD4⁺ de los linfocitos así como también diversos ligandos de la célula a ser infectada.¹ En la porción de la nucleocápside tiene proteínas puras centrales p24 y p17 (cuadro 1). Las funciones son: *env* codifica para gp160, gp120 y gp41; *gag* para p55, p24 y p17; *pol* codifica proteasa p66, p51 y p31 para la transcriptasa reversa, integrasa y ribonucleasa. Al mismo tiempo estas regiones contienen de manera superpuesta seis marcos de lectura correspondiente a genes que codifican proteínas no estructurales de singular importancia para ciertas funciones biológicas que el virus requiere durante su crecimiento, ensamblaje y replicación.⁷

El genoma del VIH contiene otros genes *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* y *vpu*, encargados de la regulación de la síntesis y de la organización de las partículas virales infecciosas.⁷⁻⁹

El precursor *gag* es escindido en 4 proteínas:

- a) p 17 – 18 para el VIH – 1 y p16 para el VIH – 2
- b) Una proteína mayor, parte de la cápside, p24/ 25 en el VIH – 1 y p 26 en el VIH-2
- c) La proteína de la nucleocápside p 7 que además promueve la dimerización y encapsulación del ARN.
- d) Una proteína p6 cuya función está en estudio. Se sabe que aquellas partículas virales mutantes que carecen de esta proteína tienen un defecto en el ensamblaje de las partículas virales hijas.

El gen *pol* codifica para una proteína de 99 aminoácidos (aa) que para poder funcionar debe de unirse a otra molécula idéntica y así formar la proteasa propiamente dicha que es una molécula homodimérica la cual participa en la síntesis del ADN y su integración en el genoma celular. Esta actúa durante las etapas tardías o avanzadas de la replicación viral, cuando la nueva partícula viral está saliendo de las células o poco después de su salida.

El gen *gag* codifica una poliproteína estructural primaria del VIH, la cual es necesaria para la formación de partículas del virus. El virus se compone de cuatro dominios estructurales: la matriz (MA), cápside (CA), núcleo cápside (NC) y el pol. Entre las principales funciones del gen *gag*, es la de sintetizar la mayor parte de estructura del virión participando en la síntesis de ADN y su integración, además de contribuir al ensamblaje de las partículas víricas y su salida de la célula.

El gen *env* codifica las glicoproteínas de envoltura, que serán sintetizadas como un gran precursor que luego es segmentado, dejando una proteína transmembrana (gp 41). En esta molécula en su parte externa posee el sitio de unión para la molécula CD4 (gp 120). Esta proteína posee otros sitios para la infectividad del virus, el más conocido V3 *loop* o bucle, principal epítopo neutralizante y sitio que promueve la unión al receptor CD4.^{9,10}

3.4 Función de las proteínas víricas.

Las proteínas de la envoltura se derivan de una glicoproteína precursora de 160 kDa, gp160, que es seccionada dentro de la célula (muy probablemente por las enzimas celulares en el aparato de Golgi) en una proteína superficial externa de la envoltura gp120 y una proteína de transmembrana gp41.

La gp120 (glicoproteína de superficie) es una glicoproteína que forma parte de la membrana externa del virus y componente esencial en la entrada de múltiples virus. Se presentan como picos de la membrana viral que consiste en trímeros de gp120 unidos entre sí y anclados en la membrana de la

proteína gp41. La proteína gp120 es esencial para la infección viral, ya que facilita la entrada del VIH en la célula huésped.⁷

La gp41 es una proteína transmembranal de la cubierta del virus de VIH que es codificada por el gen *env* del VIH. Contiene residuos muy hidrofóbicos en un segmento corto de la parte N terminal. Esta región es importante porque permite que la membrana del virión se funda con la membrana celular y permita la entrada del virus a la célula. Además de la región de fusión, hay un segundo dominio hidrofóbico en la mitad de la gp41, el cual sirve para anclar las proteínas a la doble capa de lípidos de la envoltura viral.

La p24 es una proteína nuclear principal del VIH codificada por el gen *gag* del VIH. La cual se encarga de formar la cápside del virus.

La p17 constituye la matriz del VIH-1 situado bajo la envoltura lipídica del virus. Es una proteína estructural situada en el extremo amino de tanto p55 *gag* y gp160 *gag*, dirige estas poliproteínas precursoras a la membrana plasmática, donde se produce el montaje de las partículas virales. Actualmente se sabe que juega un papel en la penetración o pérdida de la envoltura.^{11,12}

Las proteínas p6 y p7 forman la nucleocápside. La región de la p55 corresponde al péptido 6 es responsable de la incorporación de la primera proteína accesoria *vpr* al virión en formación y de la interacción con la membrana de la célula que hace posible la gemación. La p7 es responsable del reconocimiento y la incorporación del ARN al virión y además interviene facilitando la transcripción inversa.

Cuadro 1. Proteínas de VIH-1/2. ¹⁴

Nombre	Tamaño	Función	Localización
Gag MA	P 17	Anclaje a la membrana, interacción con envoltura, transporte nuclear del core viral	Virión
CA	P 24	Forma la cápside central	Virión
NC	P 7	Forma la nucleocápside, se une al ARN	Virión
	P 6	Une proteínas Vpr	
Proteasa (PR)	P 15	Escisión de gag/pol y maduración	Virión
Transcriptasa Reversa (TR)	p 66, p 51	Transcripción reversa	Virión
ARNasa H	Heterodímero	Actividad ARNasa H	Virión
Integrasa (IN)	P 31	Integración del provirus al ADN del hospedero	Virión
Env	P 120 / gp 41	Glicoproteínas virales externas que se unen al receptor CD4 y correceptores de quimiocina	Membrana plasmática, envoltura del virión
Tat	p 16 / p 14	Transactivador transcripcional viral	Inicialmente en el nucléolo y núcleo
Rev	p 19	Transporte de ARN, estabilidad y factor de utilización (fosfoproteína)	Inicialmente en el nucléolo y núcleo, después entre el núcleo y citoplasma
Vif	p 23	Promueve la maduración del virón y la infectividad	Citoplasma y virión
Vpr	p 10 - 15	Promueve la localización nuclear de complejos de preintegración, inhibe la división celular arresta células infectadas a las fases de crecimiento G2/M	Virión, núcleo
Vpu	p 16	Promueve la liberación extracelular de partículas virales, degrada CD4 en el retículo endoplasmático	Proteína de membrana integral
Nef	p 27/ p 25	Ocasiona baja regulación en CD4 y MHC I	Membrana plasmática, citoplasma
Vpx	p 12 – 16	Homologo a Vpr, no se encuentra en VIH-1 pero si en VIH-2 y SIV (Síndrome de inmunodeficiencia del simio)	Virión, posiblemente en el núcleo
Tev	p 28	Proteína tripartita tat-env-rev	Inicialmente en el núcleo y nucléolo

3.5 Entrada en la célula y replicación

La infección comienza cuando una partícula viral completa encuentra una célula con receptor CD4. La glicoproteína 120 se une fuertemente a este receptor presente en los linfocitos, macrófagos, células dendríticas, monocitos y en general a cualquier célula que exprese en su superficie al receptor CD4. Se requiere la unión simultánea a un correceptor de quimiocinas que en los linfocitos es CXCR4 y en los macrófagos CCR5. Las glicoproteínas de membrana gp120 y gp41 se unen al receptor CD4 y al correceptor CXCR4 o CCR5, y así se produce la fusión, penetración y desnudación de la cápside; quedando libre dentro del citoplasma las dos copias del ARN viral y las dos enzimas transcriptasa inversa e integrasa.¹⁶

Una vez dentro de la célula el VIH utiliza su enzima viral la transcriptasa reversa, que emplea el ARN viral como molde para ensamblar una molécula correspondiente de ADN. El ADN así formado se inserta entre los cromosomas del núcleo celular del hospedero, donde sirve de base para la replicación del virus.

La replicación del VIH se puede dividir en las siguientes etapas: 1) entrada del virus en la célula huésped tras la unión de la glicoproteína de envoltura gp120 del VIH al receptor celular CD4 y a un receptor de quimiocinas CCR5o CXCR4; 2) liberación de citoplasma de la cápside viral; 3) transcripción reversa del ARN genómico viral y formación del ADN complementario de doble cadena mediado por la transcriptasa inversa; 4) transporte del ADN al núcleo celular; 5) integración en el genoma de la célula hospedera mediante las secuencias LTR, por la acción de la integrasa; 6) transcripción de los genes provirales; 7) procesamiento de los transcritos primarios hasta ARN genómico viral y ARNm viral; 8) traducción de los ARNm a las distintas proteínas virales en el citoplasma; 9) ensamblaje de las proteínas virales; 10) salida del virión de la célula por gemación; y 11) maduración del virión fuera de la célula huésped.

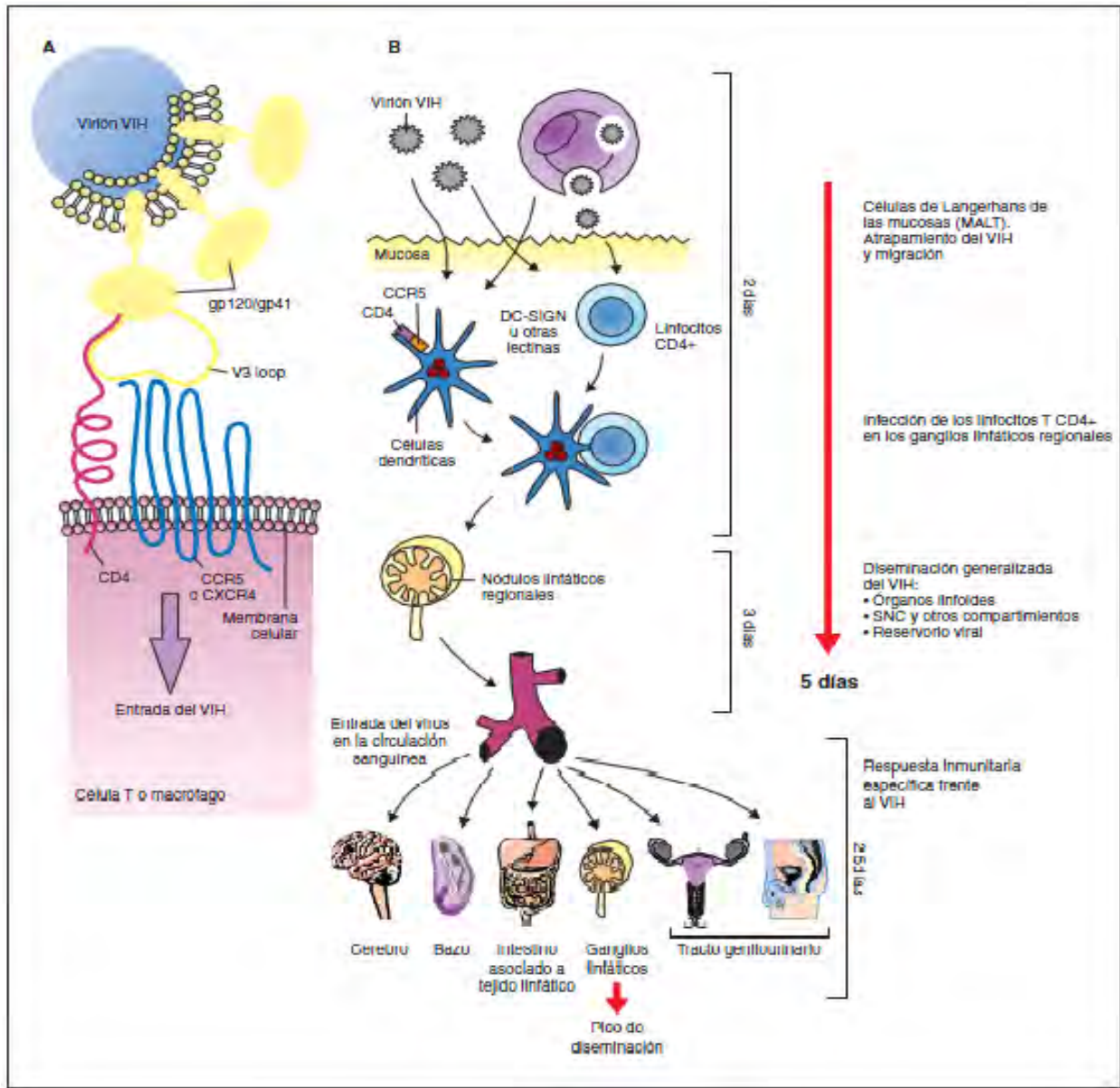


Figura 2. Transmisión de la infección por VIH y establecimiento de los reservorios. A) Interacciones entre las glucoproteínas de envoltura del VIH y la molécula CD4 y los correceptores CCR5o CXCR4, fusión y entrada del VIH. B) Secuencia inicial de la infección por el VIH adquirida por vía sexual hasta la diseminación viral.¹⁸

Cuando las partículas del virus atraviesan la mucosa las células presentadoras de antígeno (CPA) reconocen a la partícula viral como extraña, la incorporan a su superficie o la procesan por medio de fagocitosis, presentando los antígenos virales a los linfocitos. A este nivel la partícula viral puede encontrarse además con los linfocitos CD4. Por lo tanto, el virus una vez atravesada la barrera mucosa puede: a) quedar dentro de un macrófago, b) ser presentado a los linfocitos CD4 por las CPA o c) adherirse directamente a los linfocitos CD4 y comenzar a multiplicarse en su interior.

Posteriormente, los linfocitos CD4 y los macrófagos con las partículas virales; se dirigen a los ganglios linfáticos regionales, donde se encuentran con las células foliculares dendríticas, las cuales tienen proyecciones digitiformes con receptores CD4, a los cuales se unen las partículas virales. Estas son presentadas a los linfocitos quedando de esta manera infectados. De este modo a partir del ganglio regional el virus se disemina en todo el organismo infectando a toda célula que contenga receptores, CD4 particularmente órganos linfoides como nódulos linfoides, bazo, amígdalas y adenoides.

En esta etapa temprana, se puede detectar gran cantidad de partículas virales en el plasma. Esto se conoce como carga viral, en esta etapa puede llegar a 10 millones de copias del virus por mL de plasma.

En la fase aguda el número de células CD4 en la circulación decrece de 20 – 40%, por muerte celular o por dejar la circulación y dirigirse a los órganos linfoides para preparar la respuesta inmune.

En el momento inicial de la infección existen muchas partículas libres en el plasma. En un periodo de dos a tres meses se genera una respuesta inmune del huésped, produciéndose una caída drástica en la carga viral. En determinado momento, la carga viral plasmática comienza a incrementarse nuevamente, coincidiendo con la etapa clínica del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Este equilibrio se mantiene aproximadamente por 10 años. Donde la replicación viral no tiene lugar a nivel sanguíneo, la misma se da en los tejidos linfoides profundos: los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a las mucosas.

En el interior del virus se inicia el proceso de transcripción reversa que facilita la conversión del ARN genómico en ADN. Este proceso genera dos secuencias de repeticiones terminales largas o LTR (*long terminal repeat*) en cada extremo del ADN viral. Los extremos de LTR subsecuentemente participan en la integración del provirus. Una vez integrado el ADN proviral, permanecerá latente por meses y hasta años, hasta que ocurran una serie de interacciones entre el virus y el hospedero que permitan su traducción y posterior ensamblaje y maduración.

La región LTR del VIH contiene promotores virales activos que para su transcripción requieren la presencia de activadores celulares. La proteína *Tat* es requerida para la transcripción y se une a una parte de la región R del LTR (TAR: elemento transactivador de origen celular (SP-1, NF-KB). De esta manera aparecen en la infección aguda tres clases de transcritos: moléculas de ARN que producen las proteínas *gag* y *pol*: moléculas para las glicoproteínas de envoltura; y moléculas para las proteínas

reguladoras. El sistema Rev controla la exportación citoplasmática y estabilidad de estos transcritos.^{14, 15, 16, 17}

3.6 Variabilidad y distribución geográfica del VIH.

Existen dos tipos de VIH: VIH-1 que presenta distribución universal y VIH-2 endémico en África Occidental. Estos dos tipos virales no solo presentan diversidad en distribución geográfica, sino que poseen diferencias en la estructura genómica, diferencias antigénicas e incluso patogénicas (cuadro 2).

9

El VIH-2 es muy similar al VIH-1 en su genoma, excepto por la ausencia de *vpu* y la presencia de *vpx* (Figura 3). Una de las principales diferencias serológicas entre el VIH-2 y el VIH-1 reside en las glicoproteínas de la envoltura. Los anticuerpos contra VIH-2 generalmente provocan una reacción cruzada con las proteínas *gag* y *pol* del VIH-1.¹

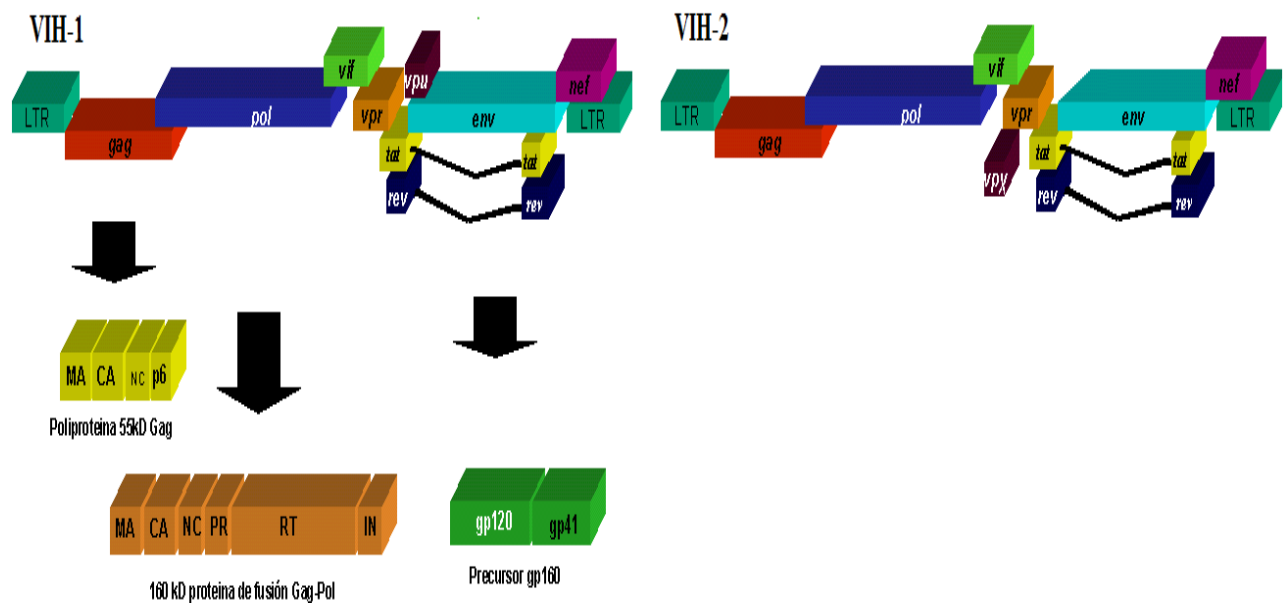


Figura 3. Estructura genómica y procesamiento de las proteínas virales. La poliproteína de 55 kD Gag está compuesta de los dominios MA (matriz), CA (cápside), NC (nucleocápside) y p6 (con actividad facilitadora durante la liberación de la partícula y responsable de la incorporación de la proteína Vpr). Por acción de un corrimiento en el cuadro de lectura (frameshift) se produce una proteína de fusión (Gag-Pol) de unos 160 kD que provee de las actividades enzimáticas. Las glicoproteínas de superficie (gp120 y gp41) son producidas a partir de un precursor poliprotéico de 160 kD y traducido a partir del gen env. El genoma de VIH codifica a su vez para varias proteínas accesorias denominadas Nef, Tat, Rev, Vif, Vpr y Vpu.⁶

Cuadro 2. Proteínas de los dos tipos de VIH ¹⁰.

Gen	VIH-1	VIH-2
<i>Gag</i>	p55	
	p17/18	p16
	p24	p25
	p7/p9	
	p6	
<i>Pol</i>	p10	
	p66	
	p51	
	p34	p34
<i>Vif</i>	p23	
<i>Vpr</i>	p15	
<i>Vpx</i>		p16
<i>Tat</i>	p14	p20
<i>Rev</i>	p19	p19
<i>Vpu</i>	p16	
<i>Env</i>	gp160	gp140
	gp120	gp125
	gp41	gp36
<i>Nef</i>	p27-30	p31

El VIH-1 es el más prevalente; se cree que el origen del VIH-2 probablemente haya sido zoonótico debido a su alta relación con el virus de inmunodeficiencia del simio (SIV). Dado que los anticuerpos con el VIH-2 y SIV tienen reacción cruzada y sus secuencias son similares.¹

El VIH debido a su variabilidad genética ha dado origen a diferentes grupos genéticos (cuadro 3).

El VIH-1 está dividido en tres grupos: grupo M (del inglés *main* o principal) que es el más común y que a su vez se divide en 10 subtipos clasificados desde la A-H, J y K, presentando entre si algunas diferencias en su comportamiento biológico; el Grupo O (*outlier*) y el grupo N (*new*) último en ser descubierto.

El VIH-2 se divide en subtipos designados por letras desde la A hasta la F.

Cuadro 3. Grupos, subtipos y distribución geográfica del VIH.

Tipo	Grupo	Subtipos	Distribución
VHI-1	M	A-K	Universal y endémicos de África
	O	-	Camerún
			Gabón
			Congo
VIH-2	N	-	Guinea-Ecuatorial Camerún
		A-F	Todos endémicos en África

Recientemente se caracterizaron variantes de VIH-1 que contienen secuencias derivadas de dos o más subtipos originadas como consecuencia de la recombinación de genomas heterogéneos. Este fenómeno es asociado a la actividad de “*copy choice*” (elección de copia) de la transcriptasa reversa, la cual comete errores en la incorporación de nucleótidos y no tiene la capacidad de corregir errores durante la retrotranscripción. Esta región es la que se encarga de codificar glicoproteínas de envoltura. La región más conservada es la de los genes *gag* y *pol*. Como consecuencia de ello los anticuerpos generados durante una eventual respuesta inmune frente a una primera generación son incapaces de neutralizar una segunda generación del virus.

La complejidad de la epidemia del VIH-1 con 3 grupos, 9 subtipos y al menos 12 formas recombinantes circulantes es evidente y este grado de diversidad no solo tiene efectos a nivel epidemiológico y taxonómico. Por estas razones en la actualidad la determinación de subtipos genéticos de VIH es importante para el entendimiento de la biología del virus y la inmunología así como el desarrollo de vacunas.

Algunas de estas formas recombinantes se han diseminado en la comunidad dando origen a las denominadas CRF (formas recombinantes circulantes). En la actualidad se han descrito 12 CRFs, cuya distribución se asocia a diferentes poblaciones y regiones del mundo. Cuando aparecen este tipo de mutaciones en proteínas que son blancos para fármacos, las partículas virales son genéticamente y fenotípicamente resistentes a estos fármacos.

3.7 Cifras oficiales en México.

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad causada por el VIH y transmitida al hombre por las siguientes vías.

1. Perinatal (de madre a hijo). En México se estima que equivale al 1% constituye la principal vía de contagio en menores de 15 años.
2. Sanguínea. En México se estima que equivale al 4-5%, específicamente se asocia al uso compartido de agujas para drogas intravenosas, en menor porcentaje se reportan casos por contagio ocupacional, transfusión y trasplante de órganos.
3. Sexual. En México equivale al 93-95 %, contagio hombre-hombre, hombre-mujer y mujer-mujer.

El Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) realiza estimaciones sobre la epidemia de VIH con la finalidad de obtener cifras globales, regionales y nacionales.

Las nuevas estimaciones del ONUSIDA indican que para finales del año 2010 existían en el mundo cerca de 34 millones de personas que vivían con VIH, de las cuales cerca del 68% vivían en el África y que en el mundo podían haber ocurrido alrededor de 2.7 millones de nuevas infecciones.

Estas estimaciones indicaban que en la región de América Latina, en la que se incluye México, la prevalencia regional de VIH en población adulta ha permanecido sin cambio, siendo cerca de 1.5 millones de personas las que vivían con VIH.

La epidemiología de la enfermedad, de acuerdo a datos oficiales de CENSIDA se presenta en el cuadro 5.¹⁹⁻²²

Cuadro 5. Epidemiología de SIDA en nuestro país hasta marzo del 2013. ¹⁹

Generalidades	Personas con VIH
Casos de SIDA notificados (1983-2012*)	162,521
Casos nuevos de SIDA diagnosticados en 2012*	752
Estados que concentran al mayor número de casos de SIDA	D.F. 25,218 México: 17,455 Veracruz: 14,974 Jalisco: 12,276 Chiapas: 7,341
Proporción de casos de SIDA en hombres	82.1%
Casos de SIDA según evolución	Vivos: 59,954 Muertos: 91,191 Desconocidos: 11,376
Casos que continúan como seropositivos a VIH (1984-2012*)	45,223
Casos nuevos a seropositivos a VIH en 2012*	739
Proporción de seropositivos a VIH en hombres	73.5% Vivos: 44,852 Muertos: 17 Desconocidos: 354
Seropositivos a VIH según evolución	
Defunciones por SIDA 2010**	5,043
Tasa de mortalidad 2011** por 100 mil habitantes	4.4
Defunciones por SIDA 2012 ***(preliminar)	4,737
Defunciones por SIDA 2012 ***(preliminar)	2,877
Estimación de personas que viven con VIH en 2011	179,478
Prevalencia del VIH (%)°	0.24

*Información preliminar hasta el 31 de marzo de 2013.

**Información oficial del INEGI.

***Información preliminar del SEED/DGE/SS.

°Estimación usando el modelo Spectrum 4.47 de ONUSIDA.

Fuente: Sistema de vigilancia epidemiológica de VIH/SIDA.

3.8 Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por VIH tiene distintos objetivos como se establece en la NOM-010-SSA2-2010. Para la prevención y el control de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana.²⁴

3.1.1 Diagnóstico de personas que se sospecha puedan estar infectadas y requieren de atención médica.

3.1.5 Seguridad en las transfusiones, productos hemoderivados y donaciones de órganos.

El desarrollo de los métodos de laboratorio necesarios para el diagnóstico definitivo de la infección por VIH, ha sido un gran avance, pues las manifestaciones clínicas, aunque sugestivas no son específicas en ningún estado de la enfermedad.²³

Conviene recordar que después de la infección con el VIH se producen una aguda viremia y antigenemia, pero con una respuesta demorada de anticuerpos.

La NOM-010-SSA2-2010 también establece las pruebas para el diagnóstico del VIH: ²⁴

3.1.11 Pruebas confirmatorias, aquellas que se realizan en el laboratorio y confirman la presencia de anticuerpos anti Virus de la Inmunodeficiencia Humana en el suero sanguíneo; incluyen metodología como la inmunoelectrotransferencia (prueba Western Blot).

3.1.12 Pruebas complementarias o especiales, a aquellas de laboratorio que determinan la presencia del virus de la Inmunodeficiencia Humana o algún componente del mismo (cultivo viral, detección de antígenos, detección cualitativa o cuantitativa de ácidos nucleicos).

3.1.13 Pruebas de tamizaje, a las de laboratorio para la detección de anticuerpos anti VIH, en plasma, suero sanguíneo, saliva, líquido crevicular, o sangre total. Incluyen metodologías como el Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA) y aglutinación. En pruebas rápidas incluye la inmunocromatografía.

Las pruebas de laboratorio empleadas para diagnosticar la infección por retrovirus humanos, se clasifican en directas e indirectas.^{25, 26, 27}

- Pruebas directas: Facilitan el diagnóstico precoz de la infección, pues permiten detectar la presencia del virus o sus constituyentes (proteínas, ácido nucleico), aun antes de desarrollarse la respuesta de anticuerpos contra ellos, pero son muy costosas, entre ellas.

- Antigenemia P24
- Cultivo viral
- Detección del virus por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- Pruebas indirectas: Revelan la respuesta inmune por parte del huésped y están basadas en pruebas serológicas para la detección de anticuerpos en el suero. La presencia de anticuerpos anti-VIH, lejos de reflejar una exposición y erradicación inmune del virus en el pasado, significa el estado de portador actual. Las pruebas serológicas son específicas para cada retrovirus (VIH-1 y VIH-2), por lo que deben hacerse de forma independiente y son a su vez de varios tipos.^{27,28}

En este sentido se dispone de reactivos para pruebas que pueden ser automatizadas, total o parcialmente, y aplicarse paralelamente a un gran número de sueros.

3.8.1 Enzimoimmunoanálisis.

Es una de las técnicas más empleadas en la actualidad para la detección del VIH. Existen distintos principios para la detección de anticuerpos (indirecto, competitivo, “sándwich” y captura).

La sensibilidad de este ensayo oscila entre 93 – 100 %, pudiendo presentarse resultados falsos negativos durante la infección primaria, en pacientes inmunosuprimidos, o por errores de proceso. La especificidad de esta técnica es del 99%.²⁹

La medida de la actividad catalítica en el enzimoimmunoanálisis homogéneo se lleva a cabo preferentemente por un método con lectura múltiple, mientras que en el heterogéneo se usa un método a dos puntos. La enzima marcadora a elección para este ensayo es la peroxidasa.²³

Existen ensayos de 1ª, 2ª y 3ª generación se utilizan según la fuente del antígeno y el formato de la prueba. Los ensayos de 1era generación utilizan lisado viral obtenido en líneas celulares de linfocitos T humanos.

Los ensayos de 2ª y 3ª generación utilizan como antígeno proteínas recombinantes o péptidos sintéticos. Son muy sensibles y los resultados son muy reproducibles. La última aportación a este tipo de pruebas ha sido la detección simultánea de antígeno p24 y anticuerpos frente al VIH (ensayos de cuarta generación) el ARCHITECT HIV Ag/Ab combo cumple con las generalidades de los ensayos de cuarta generación, poniendo de manifiesto un adelanto una a dos semanas en la detección serológica de la infección por VIH. El WB a su vez también es de cuarta generación ya que está compuesto por péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2.

3.8.2 Aglutinación

Es una reacción inmunoquímica que produce la agregación de células o partículas recubiertas con antígenos o anticuerpos.

La reacción tiene lugar en dos fases. En primer lugar, se produce una rápida interacción entre el anticuerpo y el antígeno sobre la superficie de la célula o de la partícula. En segundo lugar, las partículas se agregan y se observa aglutinación a simple vista o por medio del microscopio. Si se produce aglutinación, se dice que el anticuerpo es completo. Si el anticuerpo se une al antígeno pero no se produce aglutinación, entonces se denomina anticuerpo incompleto y la aglutinación tendrá lugar sólo si se introducen modificaciones en la reacción.

3.8.3 Pruebas de EIA de membrana (Dot-Blot)

Estas técnicas detectan los anticuerpos anti-VIH mediante un método inmunoenzimático. El antígeno, compuesto por proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de uno o ambos virus, está fijado a tiras de nitrocelulosa. La mayoría de las pruebas de detección de anticuerpos utilizan este principio. Tienen lectura visual y no requieren instrumentación, su sensibilidad y especificidad no están suficientemente evaluadas.²⁹

3.8.4 Inmunoensayo por micropartícula (MEIA).

Es una técnica de Inmunoensayo que utiliza el aislamiento de complejos anticuerpo/antígeno en una superficie de fase sólida de pequeñas esferas denominadas micropartículas.

3.8.5 Inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (CMIA).

Desde hace unos treinta años el fenómeno de la luminiscencia se ha convertido en una rama de la espectrometría aplicada, dentro de la química analítica, gracias a la nueva instrumentación y el empleo de nuevas técnicas se ha podido aplicar de forma rutinaria en el análisis tanto cualitativo como cuantitativo.

La primera aplicación de la quimioluminiscencia como técnica analítica se llevó a cabo en 1957 por Erdey con el fin de estudiar sustancias como luminol, lofina y lucigenina como indicadores volumétricos.³⁰

Gracias a las investigaciones recientes en el desarrollo de productos quimioluminiscentes para el diagnóstico clínico, la alta sensibilidad, bajos límites de detección, rangos dinámicos amplios y gran versatilidad de métodos.

3.9 Quimioluminiscencia.

La quimioluminiscencia se define como la emisión de luz asociada con la disipación de energía con una sustancia electrónicamente excitada. Si Los electrones de un componente luminiscente son estimulados por una luz en estado normal, estos dan energía en forma de luz cuando ellos regresan al estado. La emisión de luz es causada por los productos de una reacción específica química, en la cual se involucran las siguientes sustancias según el sistema automatizado que sea utilizado: éster de acridina, peróxido-ácido, hidróxido de sodio, fosfatasa alcalina. Existen condiciones para que una reacción química produzca quimioluminiscencia:

- a) Liberar la energía suficiente para producir un estado electrónico excitado.
- b) El camino de reacción debe de favorecer la formación del estado electrónicamente excitado. En el caso de que la energía química se disipe en forma de calor, mediante vibraciones o rotaciones moleculares, la reacción no será quimioluminiscente.
- c) La desactivación del estado excitado ha de producirse mediante la emisión de energía radiante o la transferencia de energía a otra molécula luminiscente.³¹

Como la intensidad de emisión en función de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción de quimioluminiscencia, las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos. Una ventaja de esta técnica es que permite utilizar una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación.

No obstante deben considerarse algunas limitaciones en el análisis por Quimioluminiscencia, como la dependencia de la emisión quimioluminiscente de varios factores ambientales que deben ser controlados, la falta de selectividad, ya que un reactivo quimioluminiscente no se limita a un único analito, y finalmente, como ocurre en otros sistemas de detección en flujo, la emisión quimioluminiscente no es constante sino que varía con el tiempo, y este perfil de emisión frente al tiempo puede variar ampliamente en diferentes sistemas quimioluminiscentes, por lo que hay que extremar el cuidado para detectar la señal en sistemas en flujo, midiendo en periodos de tiempo bien definidos.

En general una reacción de quimioluminiscencia puede generarse mediante dos mecanismos básicos: En una reacción de quimioluminiscencia directa, dos reactivos, normalmente un substrato y un oxidante en presencia de algunos cofactores, reaccionan para formar un producto o intermedio de la reacción, algunas veces en la presencia de un catalizador. Después, parte del producto o intermedio pasa a un estado electrónicamente excitado, que puede a continuación relajarse hasta el estado

fundamental con emisión de un fotón. El sustrato es el precursor, que se convierte en la molécula excitada electrónicamente, responsable de la emisión de luz, o bien actúa para transferir la energía en la quimioluminiscencia indirecta. El catalizador, enzima o ion metálico, reduce la energía de activación y proporciona el ambiente adecuado para la producción de una alta eficiencia. Durante el proceso los cofactores son necesarios en ocasiones para convertir uno o más de los sustratos en una forma capaz de reaccionar e interactuar con el catalizador, o para proporcionar un grupo saliente eficaz cuando se requiere un marcador para producir el emisor excitado.

Por el contrario la quimioluminiscencia indirecta o sensibilizada se basa en un proceso de transferencia de energía de la especie excitada a un fluoróforo. En el caso de moléculas que no pueden emitir directamente quimioluminiscencia, este proceso permite transferir su exceso de energía a un fluoróforo que a su vez es excitado, volviendo a su estado fundamental con la emisión de un fotón. Todas estas etapas dan lugar a una gran variedad de aplicaciones prácticas de la quimioluminiscencia en la fase sólida, líquida y gaseosa.³²

La quimioluminiscencia representa una alternativa automatizada de los métodos de inmunoanálisis y a diferencia de otras técnicas que se utilizan en la práctica clínica.

3.10 Western Blot

Teniendo en cuenta la importancia del diagnóstico, es necesario confirmar los resultados de la prueba de cribado mediante otra técnica. Los expertos de la OMS recomiendan la inmunotransferencia (Western Blot).

Es una de las más ampliamente utilizadas para confirmar resultados positivos en las pruebas de cribado de Ac VIH, ya que permite una discriminación puntual de la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo permite la detección de una única proteína frente a las distintas proteínas del virus.³³

Las tiras de nitrocelulosa en las que se han transferido las proteínas del virus contienen, generalmente, casi todas las proteínas estructurales del VIH, algunas proteínas precursoras de aquellas, y además otros antígenos celulares contaminantes que proceden de las células infectadas empleadas para la obtención del antígeno vírico. Algunas tiras de WB comercializadas para la detección de VIH-1 incluyen, además, algún péptido sintético, correspondiente a glicoproteínas específicas de VIH-2 efectos de identificación de la infección VIH con una sola tira de reactivo.

La prueba se basa en una técnica de ELISA indirecta sobre una tira de nitrocelulosa que contiene todas las proteínas constituyentes del VIH-1 y un control interno anti-IgG. La Banda correspondiente al

control interno se encuentra en el extremo de la tira, sin ningún número, antes de la reacción P18 y permite validar la adición de la muestra y los reactivos.

Las proteínas del VIH-1 inactivadas se separan de acuerdo con sus pesos moleculares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en medio disociativo y reductor y posteriormente se transfieren eléctricamente a una hoja de membrana de nitrocelulosa.

La técnica de WB consiste, básicamente, en la incubación de una de esas tiras con el suero problema durante un tiempo de 2-4 horas, tras lo cual se revela la presencia de anticuerpos frente a las diferentes proteínas del virus, mediante reacciones inmunoenzimáticas de distinta configuración dependiendo del fabricante. El resultado es la aparición de bandas coloreadas de mayor a menor intensidad, en el lugar de la tira de nitrocelulosa en el que están situadas las proteínas de VIH contra las cuales existen anticuerpos en el suero problema.

La lectura e interpretación de los resultados por WB debe hacerse siguiendo unas pautas.

1. Se identifican por su posición en la tira (según su peso molecular), comparando las con el control positivo, las bandas específicas de reactividad (gp 160, gp 120, p66, p55, p51, etc.), a continuación puede ser útil asignar un valor de reactividad a cada banda.
2. Existen distintos criterios de positividad para el Western Blot. El propuesto por la OMS indica que un suero es positivo cuando presenta reactividad al menos frente a dos de las 3 glucoproteínas virales gp160, gp120 ó gp41 y alguna proteína de los demás genes (*gag* y *pol*) (Figura 4). El criterio propuesto por el CDC indica que un suero es positivo cuando presenta reactividad frente a la p24 más alguna de las proteínas de superficie (gp160/120, gp41) (cuadro 6).
3. Los sueros negativos no deben mostrar reactividad frente a ninguna de las proteínas presentes en la tira control positivo, en ocasiones suelen aparecer otras bandas no estructurales o no clasificadas que no corresponden a las proteínas víricas
4. Finalmente los sueros se denominan indeterminados cuando, existiendo reactividad frente a una o más proteínas, no cumple el criterio de positividad adoptado.

Cuadro 6. Criterios de positividad de la prueba de Western Blot

Criterio	Reactividad frente a:
OMS	Dos glucoproteínas cualquiera: gp 160 ó gp 120 ó gp 41 + 1 <i>gag</i> + 1 <i>pol</i>
Cruz roja Americana	Una proteína de cada gen estructural (<i>env</i> , <i>pol</i> y <i>gag</i>)
FDA	p24 + p32 + (gp41 ó gp120 ó gp160)
CRSS	p24 + (gp41 ó gp120 ó gp160) ó p32 + (gp41 ó gp120 ó gp160)
CDC/ASTPHLD	Cualquier par. p24 + (gp41 ó gp120 ó gp160) ó p41 + (gp120 ó gp160)

FDA: *Food and Drug Administration*; CRSS: *Consortium for retrovirus Serology and Standardization*; CDC/ASTPHLD: *Center for Disease Control/Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors*.

Se han descrito resultados indeterminados por Western Blot en personas con factor reumatoide, LES, anticuerpos HLA, Toxo IgG, HCV, mujeres embarazadas, infección por VIH-2, seroconversión para VIH-1.^{34,35}

En los sueros indeterminados el seguimiento debe prolongarse al menos durante 6 meses para verificar si existe un cambio en el patrón de anticuerpos hacia la positividad o por el contrario desaparecen las bandas detectadas inicialmente, lo que retarda y dificulta el diagnóstico.

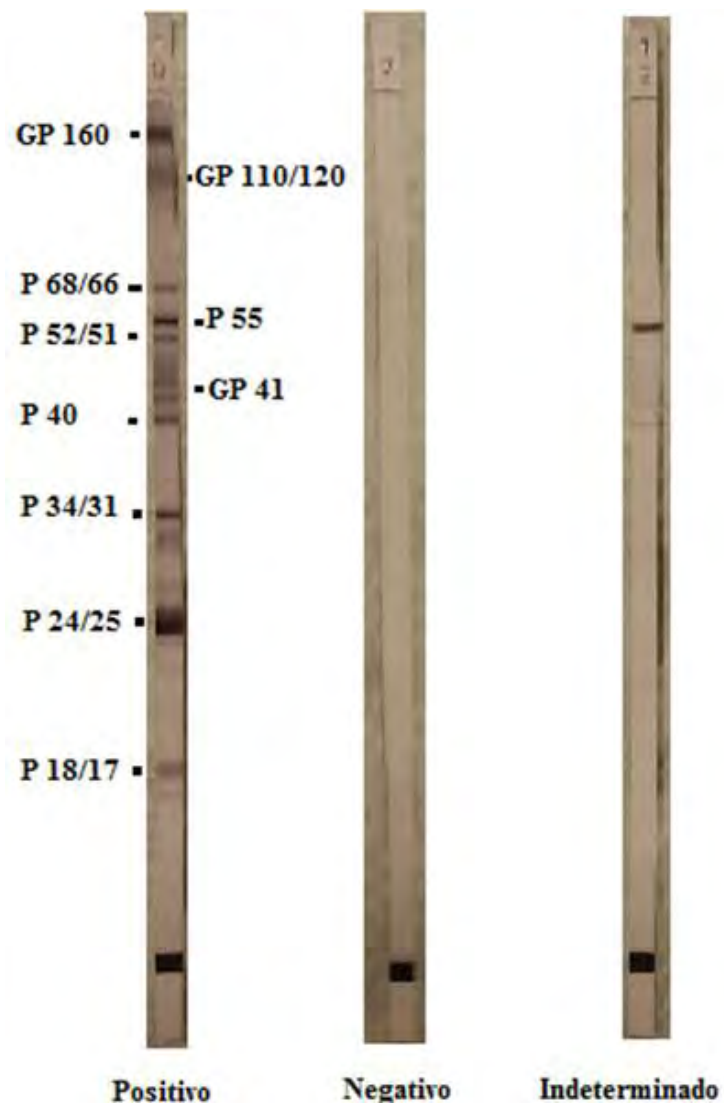


Figura 4. Esquemas de Western Blot. Negativo, positivo e indeterminado (tomada durante el proceso de las muestras).

3.11 Estudios diagnósticos

El propósito de los estudios diagnósticos es desplazar las probabilidades calculadas de la presencia de una enfermedad hacia uno u otros extremos de la escala de probabilidades, la decisión de realizar una prueba diagnóstica y particularmente la selección específica de la prueba depende del uso, la información y del objetivo de la búsqueda; determinar las probabilidades de que hubiera una enfermedad, evaluar la gravedad de un padecimiento, predecir el pronóstico de una enfermedad o vigilar la respuesta a un tratamiento.⁴⁰

Se reconocen cinco usos básicos de las pruebas diagnósticas:

- Tamizaje
- Búsqueda de casos
- Descarte de diagnóstico
- Confirmación de un diagnóstico
- Seguimiento

El nivel más básico de exámenes es el tamizado o el cribaje, en el que se hace búsqueda de una condición en una población con baja probabilidad de tenerla, esto exige un examen que tenga una enorme capacidad para encontrar a los enfermos, aún si se hace a costa de resultados falso positivos.

Otro nivel es la búsqueda de casos se presenta cuando se busca una condición en sujetos con factores de riesgo, es decir, con aumento de la probabilidad de sufrir la enfermedad. En estos casos es importante que la prueba produzca pocos falsos negativos pero también que se pueda confiar en el resultado positivo.³⁹

En algunos casos es mejor asegurarse de que una condición específica no está presente (descartar un diagnóstico), de manera que se elegirá la prueba diagnóstica que produzca la menor cantidad de falsos negativos.

El uso confirmatorio de las pruebas debe de ser empleado juiciosamente, cuando se tiene certeza o existe muy alta probabilidad de que exista una condición, realizar una prueba diagnóstica en muchos casos, puede ser innecesaria en muchos casos.³⁹

Finalmente las pruebas diagnósticas se utilizan para el seguimiento de los casos, bien para asegurarse de que ha desaparecido el diagnóstico para corroborar la evolución con el tratamiento, para controlar la aparición o desarrollo de una reacción adversa, para seguir la actividad de la enfermedad, etc.

En un mundo perfecto, los estudios diagnósticos siempre serían correctos, sin embargo, en la realidad todos los estudios son falibles.

Para los fines de cualquier análisis, el estado de “verdadero” de una enfermedad se determina con el método diagnóstico definitivo, llamado “norma de referencia” o estándar de oro. Es vital que la selección de oro sea adecuada, puesto que la evaluación de la prueba nueva será completamente inapropiada si no se tiene certeza de la presencia o ausencia de la enfermedad. De ahí que los términos sensibilidad y especificidad se usan para describir la validez de la quimioluminiscencia comparada con el Western blot.³⁹

3.12 Sensibilidad y especificidad

La capacidad para clasificar correctamente al enfermo. Para evaluar se utiliza el estándar de oro, con el objeto de seleccionar una población que tenga con certeza la condición. El cuadro 7 muestra el procedimiento que debe seguirse. Una vez seleccionado un número de sujetos con certeza según el estándar de oro, se aplica la nueva prueba y se clasifica como positivos o negativos. Se obtiene un grupo de sujetos que sí están enfermos y que son identificados por la nueva prueba como positivos. Se les llama verdaderos positivos y el cálculo de la tasa de verdaderos positivos muestra la capacidad de la prueba para clasificar correctamente al enfermo como enfermo.³⁶

Cuadro 7: Evaluación de sensibilidad

Resultado de la prueba	Sujetos enfermos
Positivo	Verdaderos Positivos
Negativo	Falsos Negativos
	100

Así como existe la duda sobre si el examen puede clasificar correctamente al enfermo, también existe la pregunta de si puede identificar al sujeto sano como sano. Para la determinación se selecciona un grupo que esté libre de la enfermedad, según el estándar de oro y se le aplica la prueba nueva. El cuadro 8 muestra cómo se hace esta evaluación. El aspecto más importante es que el examen pueda clasificar al sujeto sano como sano.⁴⁰

Cuadro 8: Evaluación de especificidad

Resultado de la prueba	Sujetos sanos
Positivo	Falsos Positivos
Negativo	Verdaderos Negativos
	100

La presentación habitual de la determinación de las pruebas se hace por medio de la tabla tetracórica.

Cuadro 9: Tabla tetracórica que se emplea en la determinación de sensibilidad y especificidad.

Resultado de la prueba	Condición de interés	
	Presente	Ausente
Positivo	A	B
Negativo	C	D
	a + c	b + d

La sensibilidad de un estudio se define como el porcentaje de personas que padece la enfermedad que interesa y tiene resultados positivos del estudio. Cuanto mayor sea la sensibilidad de un estudio es más probable que permita detectar a personas con la enfermedad que interesa. Las pruebas de alta sensibilidad son útiles en clínica para descartar una enfermedad.³⁶

La especificidad se define como el porcentaje de personas sin la enfermedad que interesa, en quienes hay resultados negativos de un estudio. Cuanto mayor sea la especificidad de un estudio, es más probable que las personas sin la enfermedad de interés no se consideren que padezcan el trastorno. Los estudios muy específicos se usan con frecuencia para confirmar la presencia de una enfermedad (las fórmulas para determinar la especificidad y sensibilidad se encuentran en el apartado de análisis estadístico).³⁶

3.13 Relación entre sensibilidad y especificidad

Existe una situación donde existe una relación absoluta de dependencia: en los resultados donde el resultado no es dicotómico *per se* y se toma un punto de corte para diferenciar al sano del enfermo. La sensibilidad y la especificidad sí están íntima e inversamente relacionadas: un cambio en el punto de corte siempre producirá una mejoría en una de las características a costa de la reducción en la otra. Mejora la sensibilidad porque puede detectarse a un número mayor de sujetos enfermos, pero se disminuye la especificidad porque se clasifica inadecuadamente a un número, también mayor de sujetos sanos, como enfermos.³⁹

La sensibilidad y la especificidad son parámetros que describen a la exactitud de un estudio. Dos mediciones concernientes al cálculo de las probabilidades de la presencia o ausencia de una enfermedad son el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN).

El VPP se define como el porcentaje de personas con resultado positivo de estudios que en realidad padece la enfermedad que interesa; permite calcular que tan probable es que la enfermedad que interesa esté presente si el resultado es positivo.

El VPN se define como el porcentaje de personas con resultado negativo de un estudio que no padece la enfermedad que interesa.³⁹

3.14 Curvas de características operativas del receptor (COR)

Estudios diagnósticos producen resultados en una escala continua de medición. En estas circunstancias puede haber muchas opciones en cuanto a dónde establecer el punto de corte entre los resultados negativos y positivos. Los diversos puntos de corte producen valores distintos de sensibilidad, con la disminución correspondiente de la especificidad. Un resumen conveniente de esta relación puede mostrarse en la gráfica denominada COR.

La gráfica se elabora con la sensibilidad en el eje vertical y la resta de la unidad menos de especificidad en el eje horizontal. En cada punto de corte se calculan la sensibilidad y $1 - \text{especificidad}$.

Un estudio diagnóstico clínicamente útil tiene una curva COR que se aleja de la diagonal de guiones.

Otra manera de considerar la curva COR de un estudio diagnóstico es considerar al eje vertical (sensibilidad) como la “señal” y al eje horizontal ($1 - \text{especificidad}$) como el “ruido”.

Un indicador resumido del rendimiento global de estudio puede calcularse como el área bajo la curva COR. Cuanto mayor sea esta área, será mejor el rendimiento.³⁷

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque no se tiene bien reportado el número de casos en los que se ha presentado un falso negativo o un falso positivo, se sabe que esto puede ser propiciado por las distintas fases de la infección, estados de inmunosupresión provocados por (embarazo, lupus eritematoso sistémico (LES), fiebre reumática (FR), etc.), infecciones por virus como hepatitis C (VHC) o cruce con anticuerpos heterófilos, entre otros, por lo que se recomienda realizar otro análisis para confirmar los resultados, siendo el más utilizado en la actualidad el Western Blot gracias a su alta especificidad, ya que permite caracterizar los anticuerpos dirigidos contra cada proteína vírica, confirmando la seropositividad o bien identificando posibles reacciones inespecíficas (indeterminados). La notificación de indeterminados es frecuente, lo que dificulta y retarda el diagnóstico. El inmunoensayo magnético quimioluminiscente (CMIA) que detecta anticuerpos para VIH-1/2 y antígeno p24 del VIH en suero humano es una técnica que se piensa puede evitar o disminuir el reporte de falsos negativos y positivos, es por esto que se propone realizar una correlación de los resultados obtenidos en la prueba de quimioluminiscencia (especialmente aquellos en los cuales se acercan al punto de corte 1.0 S/CO) y los resultados del Western Blot y así evaluar un posible patrón de asociación entre la concentración de la quimioluminiscencia y la presencia de bandas que son detectadas en el Western Blot; con la finalidad de conocer el comportamiento de la población del laboratorio CARPERMOR para evaluar si el punto de corte empleado es el correcto o si se puede realizar alguna mejora que contribuya al beneficio del paciente.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar la correlación entre el inmunoensayo magnético quimioluminiscente y el Western Blot para VIH1 en sueros humanos, así como el índice de falsos negativos y posibles cruces antigénicos.

5.2 Específicos

1. Determinar el patrón de las bandas (Ac. a proteínas víricas) y su probable relación con la concentración de Ag/Ac a VIH por la prueba de escrutinio por el método de quimioluminiscencia.
2. Detectar posibles cruces antigénicos asociados a distintas enfermedades.
3. Determinar la especificidad del método de escrutinio comparado con el método confirmatorio Western Blot.
4. Evaluar la prevalencia de detección del VIH en la población del Laboratorio de Referencia Internacional CARPERMOR en un periodo de 2 años.

6. HIPÓTESIS

Se reporta que el método de escrutinio de quimioluminiscencia es sensible y específico, por lo que tendrá una correlación positiva y estadísticamente significativa al compararlo con la prueba de Western Blot como confirmatoria, además, con el CMIA se proporcionará un diagnóstico de menos de 20% de falsos negativos o indeterminados.

7. MÉTODOS

7.1 Diseño de estudio

Transversal, observacional, retrolectivo y comparativo.

7.2 Población

500 pacientes del Laboratorio de Referencia Internacional CARPERMOR que cumplen los criterios de inclusión, del periodo 31 de abril de 2011 al 31 de marzo de 2013.

7.3 Criterios de inclusión

- Muestras que hayan sido analizadas por las dos técnicas.
- Pacientes de ambos sexos y de todas las edades
- Sin importar el resultado que tuvieron (reactivo, no reactivo).

7.4 Criterios de exclusión

- Muestras que no cuenten con ambos estudios.

8. PROCEDIMIENTO

8.1 Reconstitución de los reactivos

- Solución de lavado/Diluyente 5X

Homogenizar la solución de lavado antes de utilizarla. Diluir la solución de lavado/ diluyente a 1:5 en agua destilada (para un equipo completo se utilizan 30 mL de solución de lavado + 120 mL de agua destilada). Homogenizar y conservar 2 – 8°C.

8.2 Método ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo

Es un inmunoanálisis de dos pasos que utiliza la tecnología de inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) para determinar la presencia del antígeno p24 del VIH y de los anticuerpos frente al VIH-1 (grupos M y O) y al VIH-2 en suero y plasma de humanos.

Procedimiento de la prueba

1. Se combina la muestra, el tampón de lavado el diluyente de ensayo y las micropartículas paramagnéticas.
2. El antígeno p24 del VIH y los anticuerpos VIH-1/VIH-2 presentes en la muestra se unen a las micropartículas recubiertas de antígeno del VIH-1/VIH-2 y anticuerpo.
3. Después del lavado, el antígeno p24del VIH y los anticuerpos del VIH-1/VIH-2 se unen al conjugado de antígenos del VIH-1/VIH-2 marcados con acridinio y anticuerpo anti-p24 del VIH marcado con acridinio.
4. Las soluciones preactivadora y activadora se añaden a la mezcla de reacción después de otro ciclo de lavado
5. La reacción quimioluminiscente resultante se mide en unidades relativas de luz (URL).

Así mismo, estas muestras fueron procesadas con la prueba confirmatoria con la siguiente técnica:

8.3 Método Western blot (NEW LAV BLOT I)

Procedimiento de la prueba

1. Estabilizar los reactivos a temperatura ambiente, asegurarse de colocar adecuadamente las tiras de nitrocelulosa sobre cada celdilla con el número en la parte superior de manera visible. Es importante manipular las tiras con tenacillas de plástico.
2. Añadir 2 mL de la solución de lavado/diluyente reconstituida a cada celda.
Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente bajo agitación.
3. Añadir 20 μ L de cada suero de muestra o control a la celda correspondiente.
Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente bajo agitación.
4. Aspirar el contenido de cada celdilla sin dañar las tiras.
Lavar cada tira con 2 mL de solución de lavado/diluyente durante 1 minuto y retírela por medio de aspiración.

Volver a lavar dos veces la tira durante 5 min, bajo agitación con 2 mL de la solución de lavado/diluyente.

Retirar la solución después del último lavado.
5. Agregar 2 mL de conjugado a cada celda, la solución conjugada debe de estabilizarse previamente a temperatura ambiente.
Incubar durante 1 hora bajo agitación.
6. Lavado. Proceder como en el paso 4.
7. Agregar 2 mL de solución de revelado del color en cada celda.
Incubar bajo agitación y vigile el aspecto de la coloración deben observarse todas las bandas correspondientes a las proteínas víricas con el suero de control positivo. (Tiempo de revelado mínimo 5 minutos).
8. Detener la reacción retirando la solución de revelado y enjuagando la tira 3 veces con agua destilada.
9. Secar las tiras entre dos hojas de papel absorbente a temperatura ambiente.

Clasificar las bandas (proteínas), colocándolas perfectamente usando la marca de referencia.

8.4 Evaluación de los resultados

1. Obtener la lista de las muestras que solicitan ambos estudios.
2. Ingresar las muestras en el ARCHITEC para obtener el resultado por quimioluminiscencia.
3. Numerar las muestras y comenzar el proceso de Western Blot antes mencionado.
4. Al terminar el proceso realizar la clasificación de las bandas y de acuerdo a los criterios de la OMS definir si es positivo, negativo o indeterminado.
5. Una vez que se obtienen los resultados de ambas pruebas, se ingresan a la base de datos para que posteriormente sean analizados con base a los objetivos del proyecto.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se obtendrán las frecuencias y porcentajes de positivos, negativos por cada método, así como los indeterminados en el Western blot como medidas descriptivas, las cuáles se compararán con la prueba χ^2 . Se realiza la curva COR con los resultados cuantitativos de quimioluminiscencia y cada una de las bandas del Western blot. Así mismo, se calculará la sensibilidad, especificidad e índice de falsos positivos y negativos para el método de quimioluminiscencia mediante una tabla tetracórica de 2 x 2, con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Se considerará una prueba como estadísticamente significativa cuando se obtenga un valor $p < 0.05$. El análisis estadístico se llevará a cabo con el programa SPSS V. 17.0 y las siguientes formulas:

$$S = \frac{\textit{Verdaderos Positivos}}{\textit{V. Positivos} + \textit{F. Negativos}} \times 100\%$$

$$E = \frac{\textit{Verdaderos Negativos}}{\textit{V. Negativos} + \textit{F. Positivos}} \times 100\%$$

$$VPP = \frac{\textit{Verdaderos positivos}}{\textit{V. Positivos} + \textit{F. Positivos}} * 100\%$$

$$VPN = \frac{\textit{Verdaderos negativos}}{\textit{V. Negativos} + \textit{F. Negativos}} * 100\%$$

$$IFP = 1 - E * 100\%$$

$$INP = 1 - S * 100\%$$

Dónde:

S: Sensibilidad

E: Especificidad

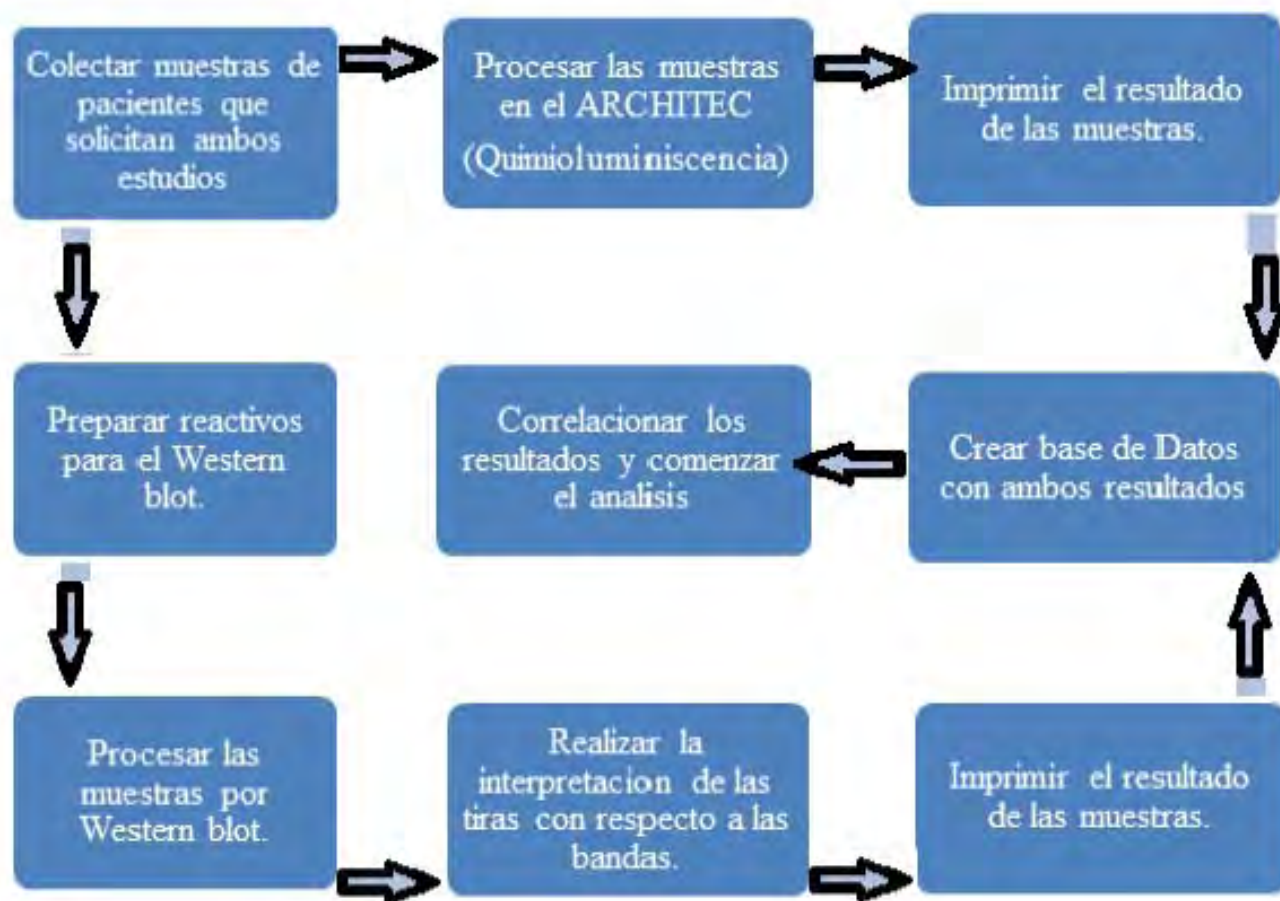
IFP: Índice de falsos positivos

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

IFN: Índice de falsos negativos

10. DIAGRAMA DE FLUJO



11. RESULTADOS

Se analizaron un total de 500 datos que cumplieron con los criterios de inclusión, con los que se determinó la prevalencia de la infección por VIH, encontrándose una prevalencia de positivos para VIH global del 276 (55%), el resumen de los resultados se muestra en el cuadro 10.

Cuadro10. Prevalencia de resultados de VIH por Western blot.

		Positivos	Negativos	Indeterminados	Total
Sexo	Mujer	36 (29%)	46 (37%)	42 (34%)	124 (25%)
	Hombre	240 (64%)	69 (19%)	67 (17%)	376 (75%)
Total		276 (55%)	115 (23%)	109 (22%)	500 (100%)

Para conocer el grupo etario en el que hay más casos de reactividad para VIH, se establecieron 15 rangos, los casos se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Prevalencia de VIH por grupo de edad de acuerdo a los criterios del INEGI.

Grupos de edades	Positivos	Negativos	Indeterminados
0 – 4	0	2	1
5 – 9	0	0	1
10 – 14	0	1	2
15 – 19	7	7	7
20 – 24	41	13	16
25 – 29	39	23	21
30 – 34	53	20	17
35 – 39	33	22	11
40 – 44	26	9	7
45 – 49	23	6	4
50 – 54	12	1	7
55 – 59	10	1	3
60 – 64	13	2	1
65 – 69	4	2	1
70 – 74	1	1	2
No hay datos de la edad	14	5	8
Total	276	115	109

De los 109 casos indeterminados, se analizó en que población hay más prevalencia los resultados se muestran en el cuadro 12, en donde se observa que 42 (34%) del total de mujeres y 67 (17%) de los hombres dieron un valor no clasificable.

Cuadro 12. Frecuencia de indeterminados por grupo de edad y sexo.

Grupos de edades analizadas	Mujeres indeterminadas	Hombres indeterminados
0 – 4	1	0
5 – 9	1	0
10 – 14	2	0
15 – 19	4	3
20 – 24	8	8
25 – 29	7	14
30 – 34	8	9
35 – 39	1	10
40 – 44	1	6
45 – 49	3	1
50 – 54	2	5
55 – 59	1	2
60 – 64	1	0
65 – 69	0	1
70 – 74	0	2
No hay datos de la edad	2	6
Total	42	67

La siguiente tabla es una relación de los resultados de quimioluminiscencia que es la prueba de cribado que se quiere evaluar comparándola con el Western Blot solo se incluyen los resultados positivos y negativos, con el fin de obtener la sensibilidad y especificidad de la prueba de quimioluminiscencia, para ello se utilizaron las fórmulas que se encuentran en el apartado de diseño estadístico.

Cuadro 13. Resultados WB (estándar de oro) vs. Quimioluminiscencia (prueba que se evalúa su confiabilidad diagnóstica).

Quimioluminiscencia	Western Blot		Total
	Positivos	Negativos	
Positivo	276	7	283
Negativo	0	108	108
Total	276	115	391

Se realizó la tabla tetracórica para la sensibilidad y la especificidad, obteniendo una sensibilidad de 100 % y una especificidad de 93 %.

$$S = \frac{276}{276} * 100\% = 100\% \qquad E = \frac{108}{115} * 100\% = 93\%$$

$$IFP = (1 - 0.93) * 100\% = 7\%$$

Cuadro 14. Se muestra la confiabilidad diagnóstica de la quimioluminiscencia con respecto a las diferentes proteínas marcadoras para VIH. Nos basamos en los resultados dicotómicos (positivo y negativo) de ambas pruebas para la obtención de la especificidad y sensibilidad de cada banda del WB.

Proteína	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	IFP	IFN
gp 160	89.10%	100%	100%	84.68%	0%	10.9%
gp110/120	88.46%	99.46%	99.63%	83.85%	0.54%	11.54%
gp 41	87.5%	98.40%	98.91%	82.58%	1.6%	12.5%
P 68/66	88.46%	93.08%	95.50%	82.93%	6.92%	11.54%
P 55	88.46%	86.70%	91.69%	81.90%	13.3%	11.6%
P 52/51	85.25%	93.08%	95.34%	79.18%	6.92%	14.75%
P 40	73.39%	99.46%	99.56%	69.25%	0.54%	26.61%
P 34/31	88.14%	97.87%	98.56%	83.25%	2.13%	11.86%
P 24/25	90.38%	81.91%	89.24%	83.69%	18.09%	9.62%
P 17/18	80.12%	88.29%	91.91%	88.29%	11.71%	19.88%

Otro de los objetivos es ver qué relación puede existir entre la concentración de la quimioluminiscencia y un patrón de bandas. Para ello se agrupa el resultado de la quimioluminiscencia en intervalos elegidos aleatoriamente y cada una de las bandas del Western blot en base a lo observado durante el tiempo del proyecto. Los resultados de quimioluminiscencia y del Western blot los introducimos a una base de datos en el programa SPSS 15 para obtener la curva COR y establecer un punto de corte donde ambos resultados son reactivos.

Cuadro 15: Correlación del valor de Quimioluminiscencia con la presencia de la banda gp 160

Intervalo Concentración S/CO	gp 160		Total de Casos
	Presente	Ausente	
0.0 – 0.99	0 (0%)	188 (36%)	188 (38%)
1.-0 – 9.99	2 (<1%)	31 (6%)	33 (7%)
10.0 – 19.99	2 (<1%)	0 (0%)	2 (<1%)
20.0 – 29.99	4 (<1%)	1 (<1%)	5 (1%)
30.0 – 59.99	11 (2%)	0 (0%)	11 (2%)
60.0 – 99.99	16(15%)	1 (<1%)	17 (3%)
100.0 – 199.99	18 (4%)	0 (0%)	18 (4%)
200.0 – 499.99	57(11%)	1 (<1%)	58 (12%)
500.0 – 999.99	167(33%)	0 (0%)	167(33%)
1000.0 – 1099.99	1(<1%)	0 (0%)	1 (<1%)
Total	278	222	500

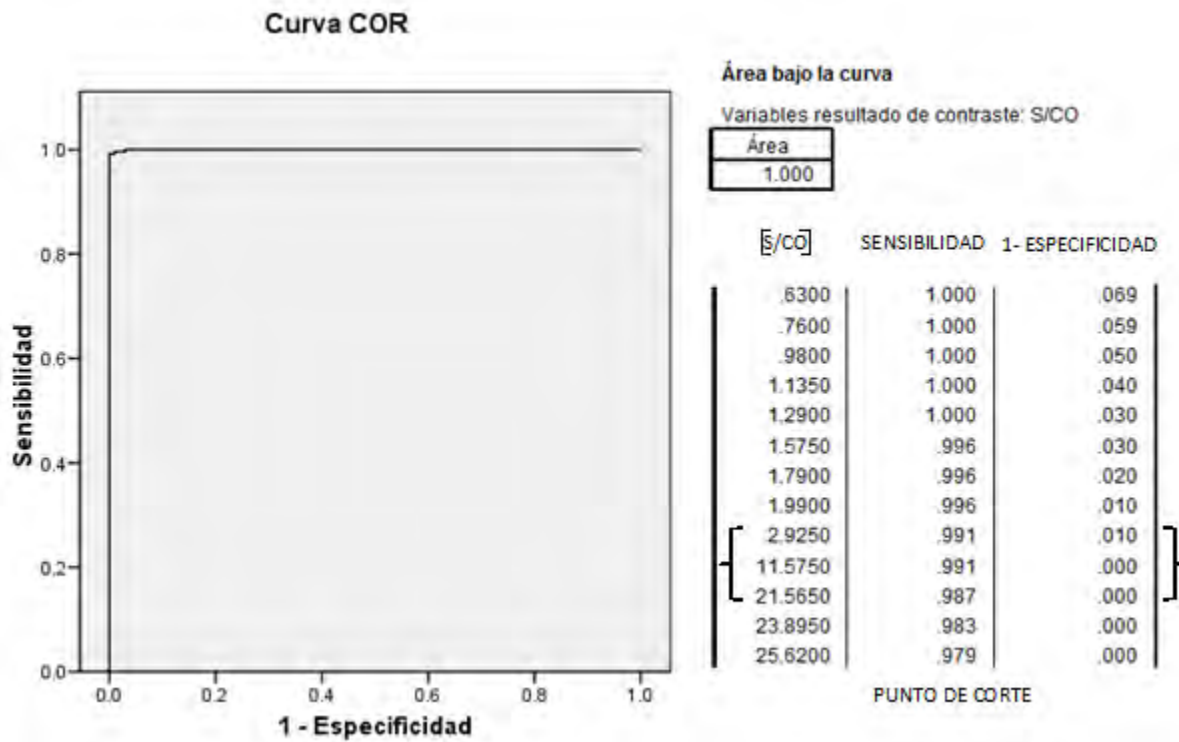


Figura 5. Curva operación-receptor para establecer el punto de corte de quimioluminiscencia este valor indica la presencia de la proteína gp160 con la mayor sensibilidad y especificidad.

Cuadro 16: Correlación del valor de Quimioluminiscencia con la presencia de la banda gp 120/110

Intervalo Concentración S/CO	gp 120/110		Total de Casos
	Presente	Ausente	
0.0 – 0.99	1 (<1%)	187 (37%)	188 (38%)
1.-0 – 9.99	2 (<1%)	31 (<1%)	33 (7%)
10.0 – 19.99	2 (<1%)	0 (0%)	2 (<1%)
20.0 – 29.99	4 (<1%)	1 (<1%)	5 (1%)
30.0 – 59.99	11 (2%)	0 (0%)	11 (2%)
60.0 – 99.99	14 (3%)	3 (<1%)	17 (3%)
100.0 – 199.99	18 (4%)	0 (0%)	18 (4%)
200.0 – 499.99	57 (11%)	1 (<1%)	58 (12%)
500.0 – 999.99	167(33%)	0 (0%)	167 (33%)
1000.0 – 1099.99	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)
Total	277	223	500 (100%)

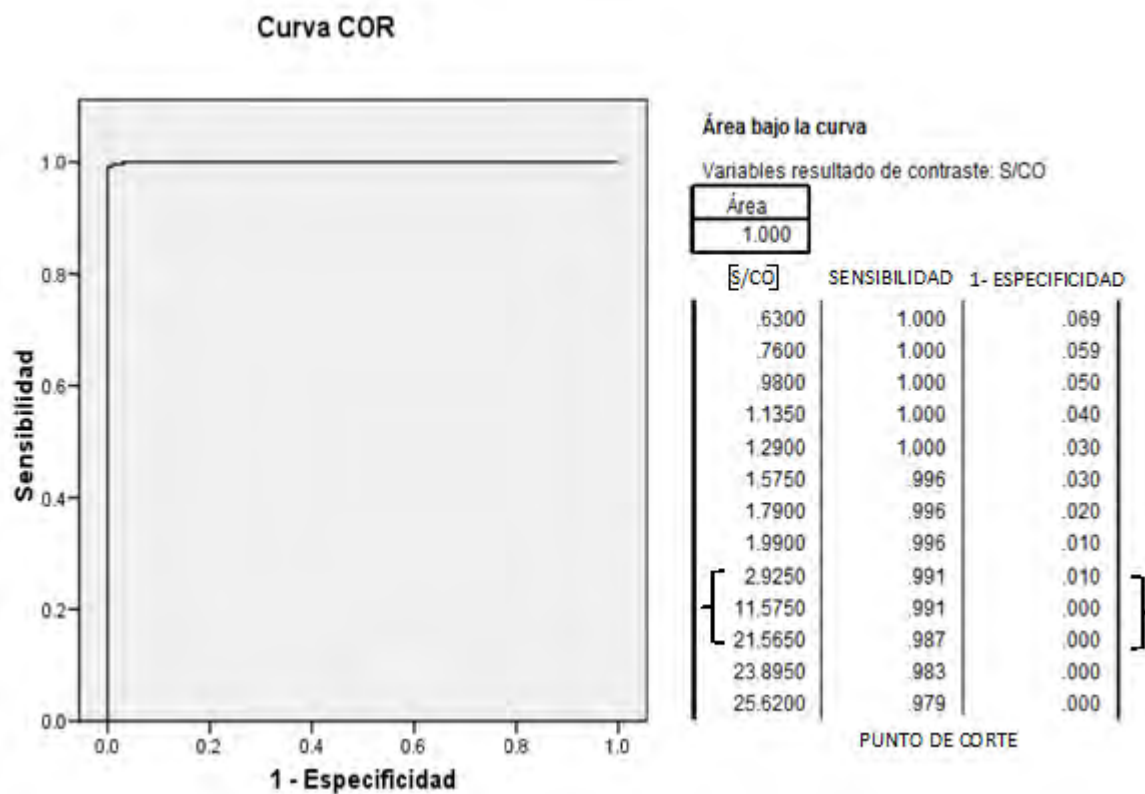


Figura 6. Curva operación-receptor para establecer el punto de corte de quimioluminiscencia este valor indica la presencia de la proteína gp120/110 con la mayor sensibilidad y especificidad.

Cuadro 17: Correlación del valor de Quimioluminiscencia con la presencia de la banda p 68/66

Intervalo Concentración S/CO	p 68/66		Total de Casos
	Presente	Ausente	
0.0 – 0.99	13 (3%)	175 (35%)	188 (38%)
1.0 – 9.99	6 (5%)	27 (5%)	33 (7%)
10.0 – 19.99	2 (<1%)	0 (0%)	2 (<1%)
20.0 – 29.99	4 (<1%)	1 (<1%)	5 (1%)
30.0 – 59.99	9 (2%)	2 (<1%)	11 (2%)
60.0 – 99.99	14 (3%)	3 (<1%)	17 (3%)
100.0 – 199.99	17 (3%)	1 (<1%)	18 (4%)
200.0 – 499.99	57 (11%)	1 (<1%)	58 (12%)
500.0 – 999.99	166 (33%)	1 (<1%)	167 (33%)
1000.0 – 1099.99	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)
Total	289	211	500

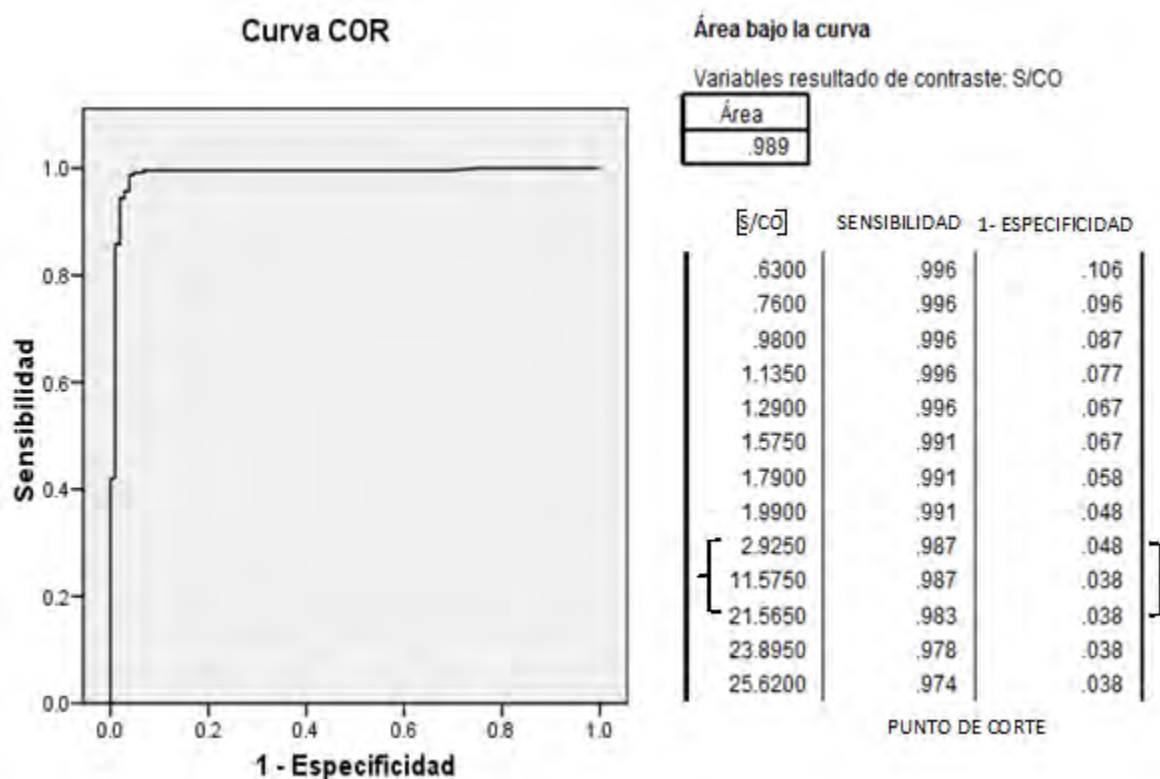


Figura 7. Curva operación-receptor para establecer el punto de corte de quimioluminiscencia este valor indica la presencia de la proteína p68/66 con la mayor sensibilidad y especificidad.

Cuadro 18: Correlación del valor de Quimioluminiscencia con la presencia de la banda p 55

Intervalo Concentración S/CO	p 55		Total de Casos
	Presente	Ausente	
0.0 – 0.99	25 (5%)	163 (33%)	188 (38%)
1.-0 – 9.99	7 (1%)	26 (25%)	33 (7%)
10.0 – 19.99	2 (<1%)	0 (0%)	2 (<1%)
20.0 – 29.99	4 (<1%)	1 (<1%)	5 (1%)
30.0 – 59.99	10 (2%)	1 (<1%)	11 (2%)
60.0 – 99.99	16 (3%)	1 (<1%)	17 (3%)
100.0 – 199.99	17 (3%)	1 (<1%)	18 (4%)
200.0 – 499.99	54 (11%)	4 (<1%)	58 (12%)
500.0 – 999.99	165 (33%)	2 (<1%)	167 (33%)
1000.0 – 1099.99	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)
Total	301	199	500 (100%)

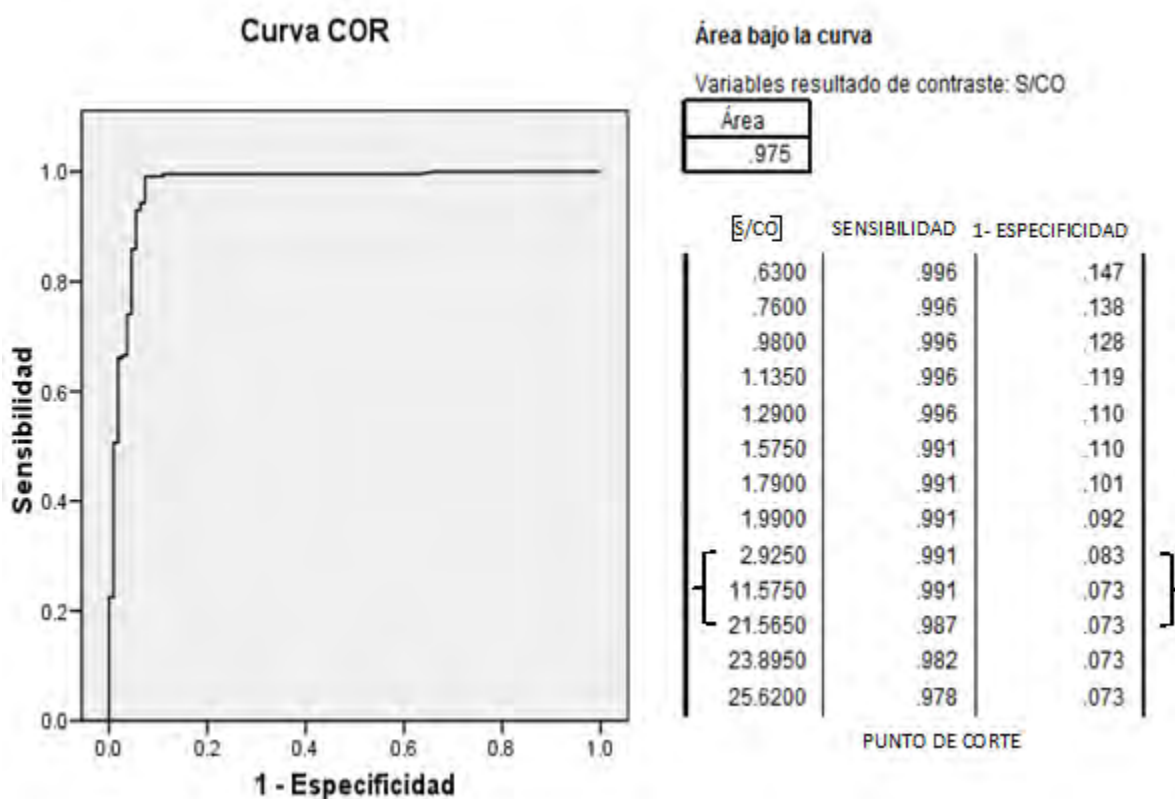


Figura 8. Curva operación-receptor para establecer el punto de corte de quimioluminiscencia este valor indica la presencia de la proteína p55 con la mayor sensibilidad y especificidad.

Cuadro 19: Correlación del valor de Quimioluminiscencia con la presencia de la banda p 52/51

Intervalo Concentración S/CO	p 52/51		Total de Casos
	Presente	Ausente	
0.0 – 0.99	13 (3%)	175 (35%)	188 (38%)
1.-0 – 9.99	5 (1%)	28 (6%)	33 (7%)
10.0 – 19.99	1 (<1%)	1 (<1%)	2 (<1%)
20.0 – 29.99	3 (<1%)	2 (<1%)	5 (1%)
30.0 – 59.99	9 (2%)	2 (<1%)	11 (2%)
60.0 – 99.99	12 (2%)	5 (1%)	17 (3%)
100.0 – 199.99	18 (4%)	0 (0%)	18 (4%)
200.0 – 499.99	54 (11%)	4 (<1%)	58 (12%)
500.0 – 999.99	163 (33%)	4 (<1%)	167 (33%)
1000.0 – 1099.99	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)
Total	279	221	500

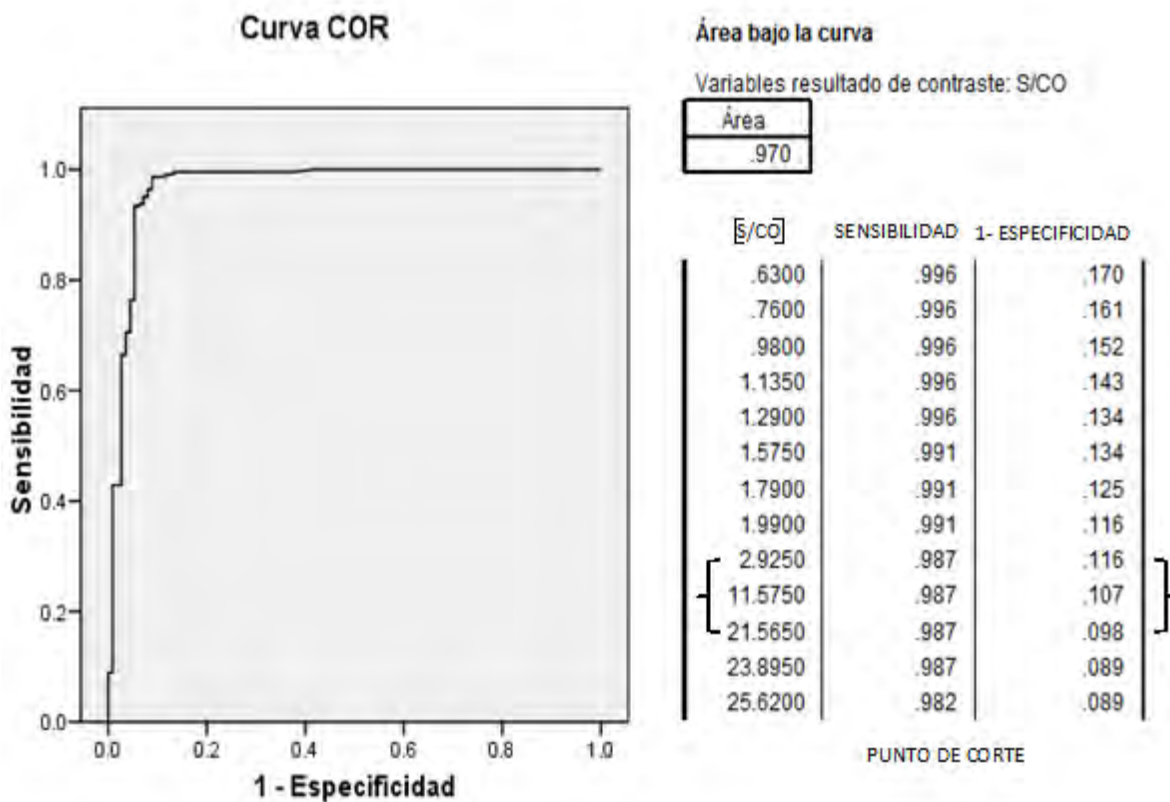


Figura 9. Curva operación-receptor para establecer el punto de corte de quimioluminiscencia este valor indica la presencia de la proteína p52/51 con la mayor sensibilidad y especificidad.

Cuadro 20: Correlación del valor de Quimioluminiscencia con la presencia de la banda gp 41

Intervalo Concentración S/CO	gp 41		Total de Casos
	Presente	Ausente	
0.0 – 0.99	3 (<1%)	185 (37%)	188 (38%)
1.-0 – 9.99	4 (<1%)	29 (6%)	33 (7%)
10.0 – 19.99	1 (<1%)	1 (<1%)	2 (<1%)
20.0 – 29.99	5 (1%)	0 (0%)	5 (1%)
30.0 – 59.99	10 (2%)	1 (<1%)	11 (2%)
60.0 – 99.99	14 (3%)	3(<1%)	17 (3%)
100.0 – 199.99	17 (3%)	1 (<1%)	18 (4%)
200.0 – 499.99	57 (11%)	1 (<1%)	58 (12%)
500.0 – 999.99	164 (33%)	3 (<1%)	167 (33%)
1000.0 – 1099.99	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)
Total	276	224	500

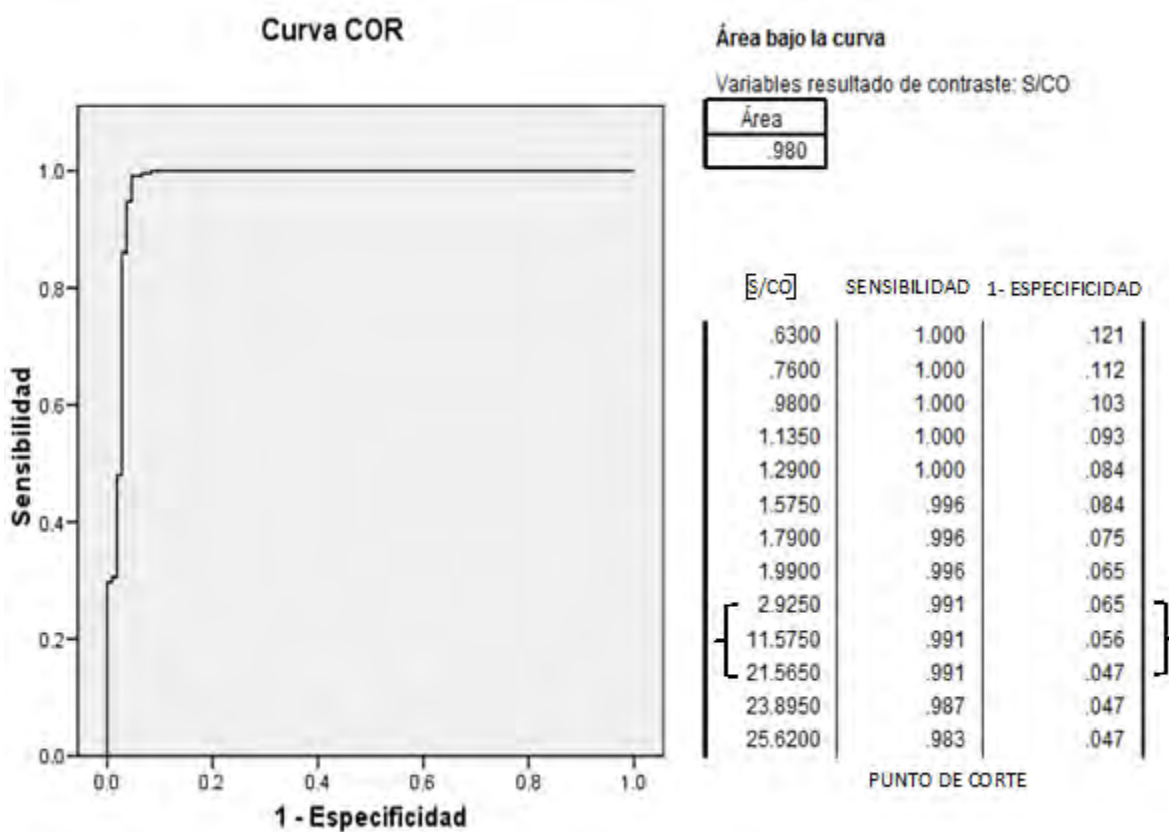


Figura 10. Curva operación-receptor para establecer el punto de corte de quimioluminiscencia este valor indica la presencia de la proteína gp41 con la mayor sensibilidad y especificidad.

Cuadro 21: Correlación del valor de Quimioluminiscencia con la presencia de la banda p 40

Intervalo Concentración S/CO	p 40		Total de Casos
	Presente	Ausente	
0.0 – 0.99	1 (<1%)	187 (37%)	188 (38%)
1.-0 – 9.99	2(<1%)	31 (6%)	33 (7%)
10.0 – 19.99	1 (<1%)	1 (<1%)	2 (<1%)
20.0 – 29.99	4 (<1%)	1 (<1%)	5 (1%)
30.0 – 59.99	9 (2%)	2 (<1%)	11 (2%)
60.0 – 99.99	14 (3%)	3 (<1%)	17 (3%)
100.0 – 199.99	15 (3%)	3 (<1%)	18 (4%)
200.0 – 499.99	43 (9%)	15 (3%)	58 (12%)
500.0 – 999.99	140 (28%)	27 (6%)	167 (33%)
1000.0 – 1099.99	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)
Total	230	270	500

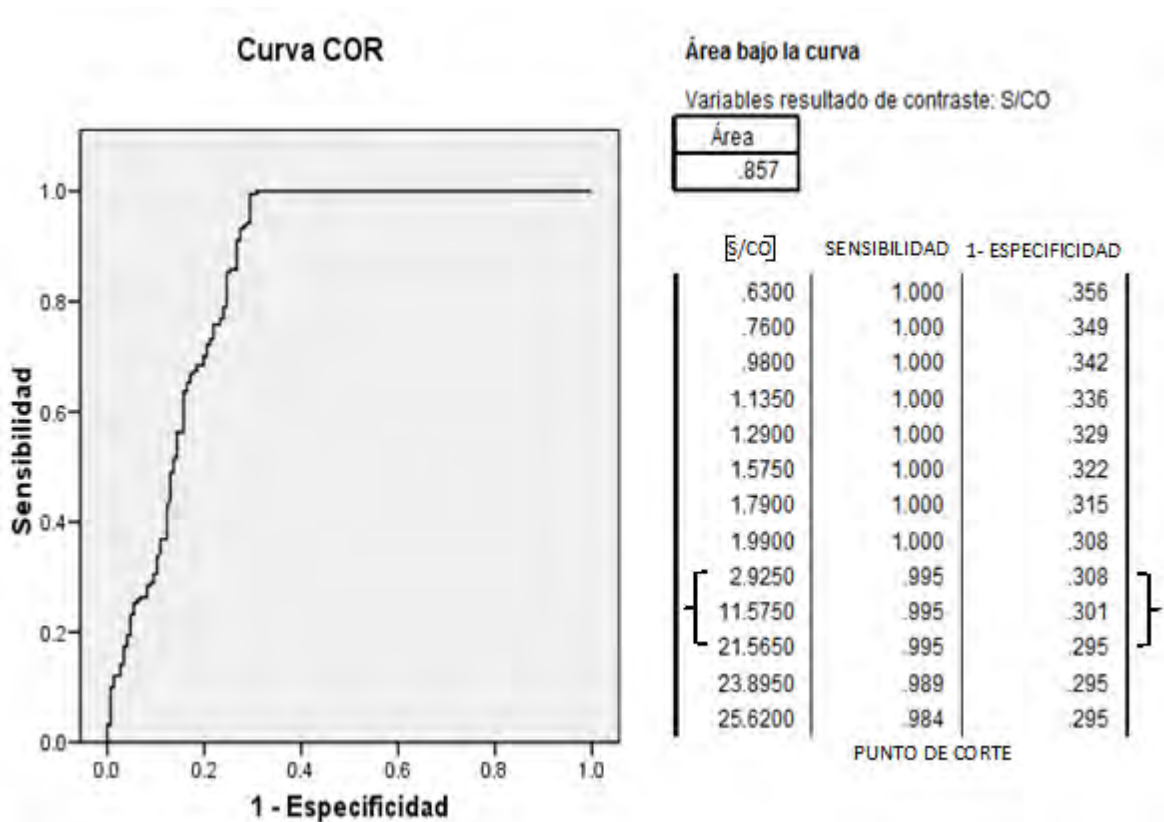


Figura 11. Curva operación-receptor para establecer el punto de corte de quimioluminiscencia este valor indica la presencia de la proteína gp40 con la mayor sensibilidad y especificidad.

Cuadro 22: Correlación del valor de Quimioluminiscencia con la presencia de la banda p 34/31

Intervalo Concentración S/CO	p 34/31		Total de Casos
	Presente	Ausente	
0.0 – 0.99	4 (<1%)	184 (37%)	188 (38%)
1.-0 – 9.99	6 (1%)	27 (5%)	33 (7%)
10.0 – 19.99	2 (<1%)	0 (0%)	2 (<1%)
20.0 – 29.99	4 (<1%)	1 (<1%)	5 (1.0%)
30.0 – 59.99	9 (6%)	2 (<1%)	11 (2%)
60.0 – 99.99	14 (3%)	3 (<1%)	17 (3%)
100.0 – 199.99	17 (3%)	1 (<1%)	18 (3%)
200.0 – 499.99	57(11%)	1 (<1%)	58 (12%)
500.0 – 999.99	165 (33.0%)	2 (<1%)	167 (33%)
1000.0 – 1099.99	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)
Total	279	221	500

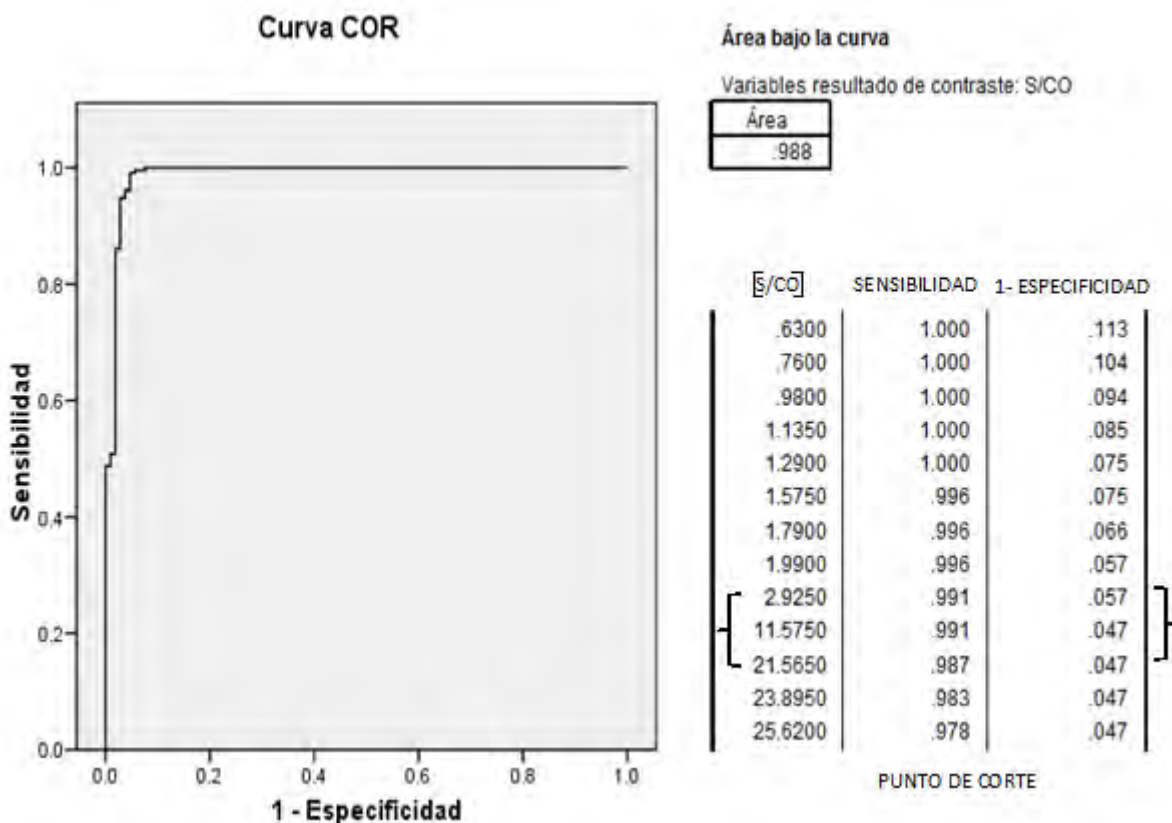


Figura 12. Curva operación-receptor para establecer el punto de corte de quimioluminiscencia este valor indica la presencia de la proteína p34/31 con la mayor sensibilidad y especificidad.

Cuadro 23: Correlación del valor de Quimioluminiscencia con la presencia de la banda p 24/25

Intervalo Concentración S/CO	p 24/25		Total de Casos
	Presente	Ausente	
0.0 – 0.99	34 (6%)	154 (31%)	188 (38%)
1.-0 – 9.99	11 (2%)	22 (5%)	33 (7%)
10.0 – 19.99	2 (<1%)	0 (0%)	2 (<1%)
20.0 – 29.99	4 (<1%)	1 (<1%)	5 (1%)
30.0 – 59.99	10 (2%)	1 (<1%)	11 (2%)
60.0 – 99.99	17 (3%)	0 (0%)	17 (3%)
100.0 – 199.99	18 (4%)	0 (0%)	18 (4%)
200.0 – 499.99	55 (11%)	3 (<1%)	58 (12%)
500.0 – 999.99	164 (33%)	3 (<1%)	167 (33%)
1000.0 – 1099.99	1 (<1%)	0 (0%)	1 (0.2%)
Total	316	184	500

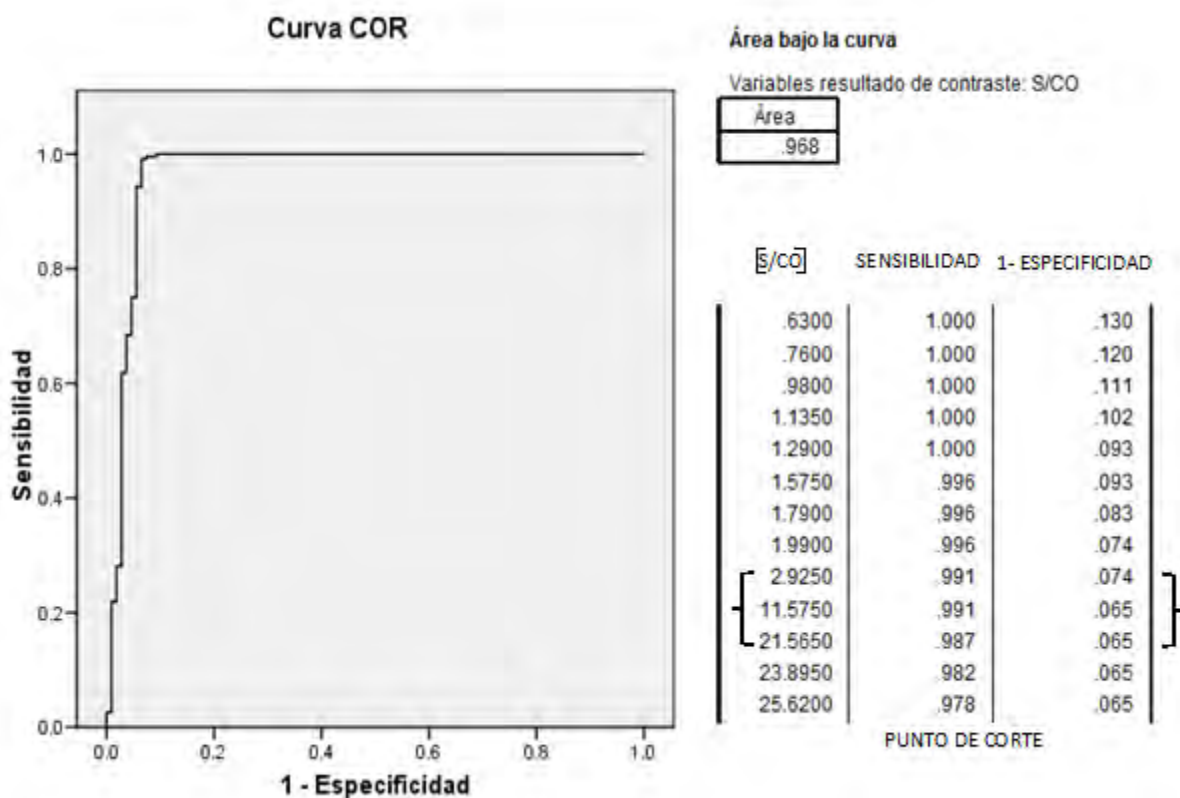


Figura 13. Curva operación-receptor para establecer el punto de corte de quimioluminiscencia este valor indica la presencia de la proteína p24/25 con la mayor sensibilidad y especificidad.

Cuadro 24: Correlación del valor de Quimioluminiscencia con la presencia de la banda p 18/17

Intervalo Concentración S/CO	p 18/17		Total de Casos
	Presente	Ausente	
0.0 – 0.99	22 (4%)	166 (33%)	188 (38%)
1.-0 – 9.99	9 (2%)	24 (4%)	33 (7%)
10.0 – 19.99	2 (0.4%)	0 (0%)	2 (<1%)
20.0 – 29.99	4 (1%)	1 (<1%)	5 (1%)
30.0 – 59.99	8 (2%)	3 (<1%)	11 (2%)
60.0 – 99.99	13 (3%)	4 (<1%)	17 (3%)
100.0 – 199.99	18 (4%)	0 (0%)	18 (4%)
200.0 – 499.99	45 (9%)	13 (3%)	58 (12%)
500.0 – 999.99	150 (30%)	17 (3%)	167 (33%)
1000.0 – 1099.99	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)
Total	272	225	500

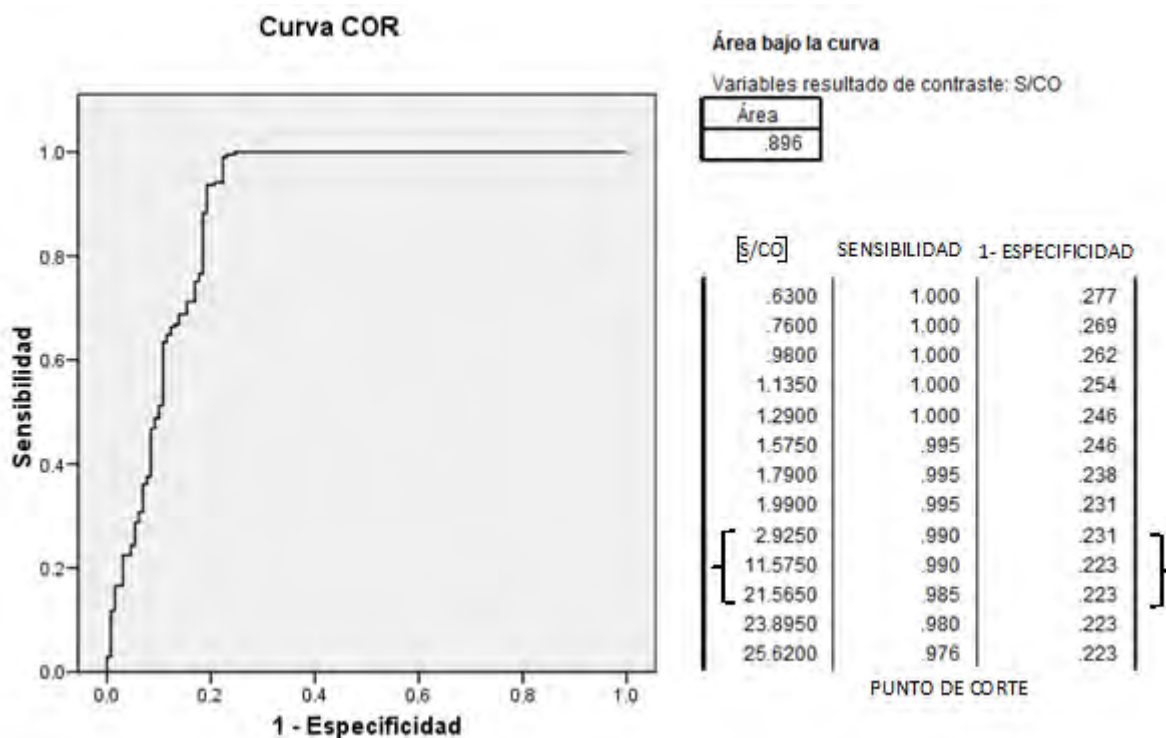


Figura 14. Curva operación-receptor para establecer el punto de corte de quimioluminiscencia este valor indica la presencia de la proteína p18/17 con la mayor sensibilidad y especificidad.

En el cuadro 25 se presentan los resultados de los 109 casos de indeterminados donde se observa la frecuencia para cada una de las 10 bandas del Western blot.

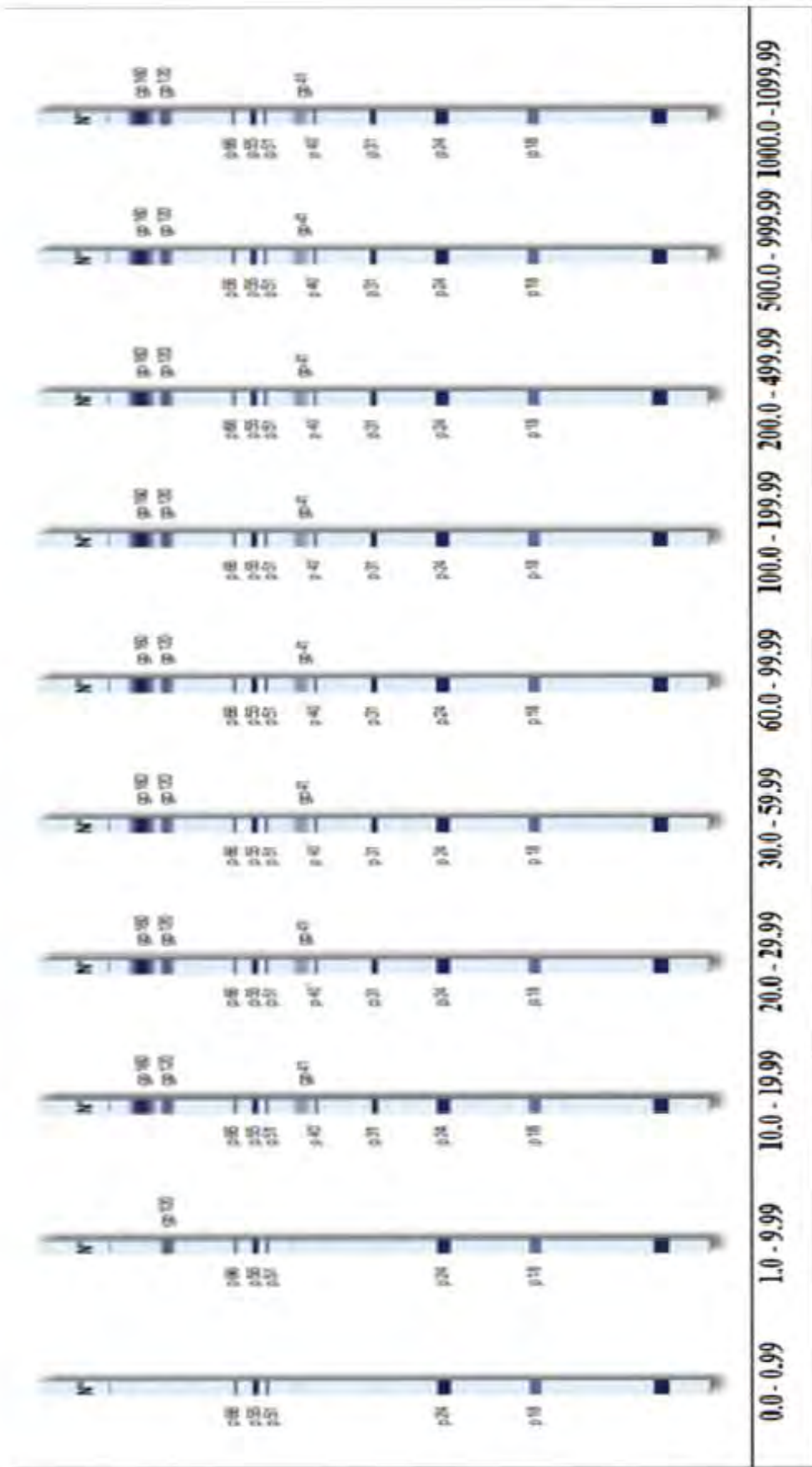
Cuadro 25. Frecuencia con la que aparecen las bandas en los casos indeterminados

Banda	Indeterminados	%
gp 160	2	1.83
gp 110/120	1	0.91
p 68/66	16	14.67
p 55	33	30.27
p 52/51	15	13.76
gp 41	6	5.50
p 40	4	3.66
p 34/31	8	7.33
p 24/25	47	43.11
p 18/17	30	27.52

En el cuadro 26 se presenta el número de bandas que presentan los indeterminados, destaca que la mayoría de los indeterminados se presenta con una sola banda.

Cuadro 26: Número de bandas que se presentan en los casos indeterminados

Número de indeterminados	Número de bandas
74	1
23	2
7	3
3	4
2	5



Intervalo de concentración/Relación de bandas

Figura 15: En la imagen podemos observar el patrón de bandas del Western blot que se presenta conforme al incremento de la concentración de la quimioluminiscencia en las muestras no reactivas y reactivas, sobresaliendo los dos intervalos de concentración en los cuales se presentan algunas bandas del Western blot generalmente muestras indeterminadas.

12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el cuadro 1 podemos observar la tendencia de los casos positivos, negativos e indeterminados de las muestras de mujeres (124=25%) y hombres (376= 75%) analizadas, en este estudio se observó que existe un mayor número de casos positivos en hombres (64%) que en mujeres (29%) esto puede deberse a que en México se está dando una apertura a la diversidad sexual lo que conlleva a la transmisión de VIH por la vía sexual, los datos del CENSIDA indican que el 94% de contagios se producen de esta manera.¹⁹ Las cifras del CENSIDA indican que los contagios por VIH corresponden en relaciones hombre-hombre (32%), un amplio sector de estos hombres practique el bisexualismo 22% lo que provoca que se dé el contagio hombre-mujer 41%; esto aunado a otro tipo de vías de contagio como lo son; madre-hijo, uso de drogas, en un menor caso transfusiones de órganos o tejidos gracias al riguroso control de calidad que se está teniendo en los bancos de sangre.

Nuestros resultados de casos positivos en nuestra población (55%) son muy altos ya que la mayoría de las muestras analizadas son de pacientes que tuvieron relaciones sexuales de alto riesgo, en México la prevalencia de los casos de VIH positivos es de 0.24%, esto es si bien los datos del CENSIDA indican una “proporción de seropositivos a VIH en hombres” de 73.5%, los resultados obtenidos en este estudio indican una semejanza ya que el 64% de los hombres a quienes se les realizó el estudio resultaron positivos a VIH.

El cuadro 2 nos muestra la prevalencia de resultados positivos, negativos e indeterminados de acuerdo al grupo de edades que presentan el mayor porcentaje para cada uno de los resultados del WB concuerdan con las edades reproductivas siendo de los 20 años a los 34 años los casos tanto de positivos como de indeterminados, a esto se podría sumar que también las personas que en esta etapa tienden a desarrollarse en ambientes de universidad o laborales donde las interacciones con otras personas son más frecuentes, las cifras del CENSIDA indican que 44% de personas de 20 - 29 años no usan condón en sus relaciones sexuales y el 69% en edades de 30 – 39 no usan condón.⁴⁶

Los casos indeterminados (cuadro 3) por grupo de edad y sexo representan poco más de la quinta parte del estudio que se realizó y en todos estos casos como recomienda la CDC⁴³ (Centers for Disease Control) deben de realizarse nuevamente el estudio en 6 meses, en México la secretaria de salud de acuerdo al manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica del VIH/SIDA, hace la recomendación de repetir en los 3 meses posteriores al resultado de WB indeterminado, estipulado en el algoritmo para el diagnóstico serológico de infección por el VIH ^{35,43}. Ya que existen diversas etapas de la infección donde se pueden estar enmascarando anticuerpos que en el momento de

realizar el estudio no pueden ser detectados por la metodología no por una limitante de está sino más bien por la etapa en la que el paciente podría estar pasando.

Se pueden presentar en rangos que van desde 4% al 20% o más de las pruebas de WB, con bandas presentes contra las proteínas del VIH-1, que no cumplen criterios para un resultado positivo.⁵

Como se mencionó anteriormente la mayoría de los casos indeterminados coinciden con las edades reproductivas y para realizar este análisis haremos el uso de las referencias ya que los casos de indeterminados pueden suceder por diversos factores como:

- Periodo de ventana: el tiempo que transcurre entre la exposición y que la prueba de WB se haga positiva. Generalmente el 50% de los pacientes infectados se detectan a las 3 semanas y casi la mitad restante en los dos meses siguientes. Todos los pacientes seroconvierten dentro de los primeros seis meses.³⁵
- Seroconversión: ocurre ocasionalmente en pacientes en fase tardía de la enfermedad. También ha sido reportada en pacientes con reconstitución inmunológica debida a la terapia antirretroviral altamente efectiva.³⁵
- Agammaglobulinemia.
- Infección de cepas de virus tipo O ó N o con el VIH-2; el VIH-2.
- Muestras hemolizadas.
- Error técnico o del laboratorio.

Se puede descartar el VIH-2 ya que se encuentra comúnmente en países de África; se puede presentar en ciudades cosmopolitas (Nueva York, Paris, Madrid, Tokio, etc.) esto lo podemos sustentar con una tesis elaborada en 2005 donde analizaron casos de VIH indeterminados y se les realizó el WB para VIH-2. Para su estudio consideraron los criterios de la OMS donde se considera de suma importancia la presencia de bandas correspondientes al gen ENV para considerar que una muestra es positiva para VIH-2; también que los resultados pueden ser considerados negativos si hay una muy débil franja p16. En este estudio analizaron 200 casos indeterminados para VIH-1 donde se obtuvieron 159 muestras indeterminadas para VIH-2, 4 negativas y 37 muestras que consideran negativas ya que presentaron solo la banda p 16.⁴¹

El cuadro 4 nos presenta la sensibilidad y especificidad de la prueba de quimioluminiscencia para evaluar la confiabilidad diagnóstica para el diagnóstico de VIH comparándolo con la prueba estándar WB. Con la ayuda de ese cuadro obtuvimos que la quimioluminiscencia tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 93% estos resultados son similares a un estudio donde compararon tres

distintas pruebas de tamizaje (Abbott HIV-1 EIA recombinante, Abbott HIV Ab HIV-1/HIV-2y Serodia-HIV Fujirebio Inc.) y para el reactivo que detecta anticuerpos VIH-1/VIH-2 obtuvieron una especificidad de 99.9% y una sensibilidad de 100%.

El resultado que se obtuvo nos indica que la prueba ARCHITEC HIV Ag/Ab es confiable (S 100% y E 93 %) para el diagnóstico del VIH y tiene una baja tasa de falsos positivos 7%.

En el cuadro 5 podemos observar las bandas que presentan mayor especificidad para el diagnóstico de VIH con el ARCHITECT HIV Ag/Ab se debe a que el reactivo tiene la capacidad de detectar el antígeno p 24 del VIH, anticuerpo anti-VIH-1 o el anticuerpo anti-VIH-2.

La proteína de transmembrana (TMP) es clave para la serodetección de la infección por el VIH, debido a su papel inmunógeno y como antígeno diana. Los anticuerpos frente a TMP son los primeros en aparecer cuando un individuo infectado por el VIH se convierte en seropositivo. La respuesta de los anti-TMP se mantiene relativamente fuerte durante el desarrollo de la enfermedad, como se demuestra prácticamente universal de los anticuerpos frente a la proteína transmembrana en las fases asintomática y sintomática de la infección por el VIH. Las TMP del VIH-2 y de los grupos M y O del VIH-1 están presentes en el reactivo mediante 5 antígenos recombinantes y 2 péptidos sintéticos derivados de secuencias de proteínas transmembrana nativas. Los anticuerpos producidos contra la TMP de una cepa vírica dentro de un grupo determinado pueden reaccionar bien, reaccionar poco o no reaccionar frente a la TMP de una cepa vírica de un tipo o grupo diferente.

Los cuadros 6 al 15 nos ayudan a plantear si existe una relación estrecha entre la concentración de la quimioluminiscencia S/ CO y la presencia de bandas, se observa claramente que los valores mayores de 11.0 S/CO para la quimioluminiscencia, comienzan a hacerse presentes las bandas del Western blot dando como resultado positivo para VIH tomando en cuenta los criterios de la OMS. Si observamos las curvas COR coincide el punto de corte mayor a 11.0 S/CO donde se obtiene la mayor sensibilidad y la especificidad para cada banda. De tal manera que todos los resultados que sean mayores al punto de corte de 11.0 S/CO podemos inferir un resultado positivo a VIH sin prescindir del Western blot ya que este último no se puede sustituir por norma (NOM-010-SSA-2010) y por recomendaciones de la OMS, se debe de realizar la prueba confirmatoria después de un resultado reactivo.

A continuación analizaremos el cuadro 16 donde claramente se observa, que las bandas p24 y p 17 del WB tienen el mayor porcentaje de indeterminaciones. Las causas de indeterminados son muy variados y no están muy esclarecidas, anteriormente discutimos distintas enfermedades que pueden dar un cruce en el WB provocando que se origine un resultado indeterminado.

También existen otras condiciones como causa de indeterminación cuando aparecen bandas p24 y p17, que a continuación señalaremos.

p24 aislada

- Frecuentemente en embarazos
- Multitransfundidos

La banda de p55 se detecta generalmente cuando hay una fuerte reactividad a p24 y / o p17. Las bandas consideradas como p24 y p17 son ambos fragmentos GAG al igual que la p55, de ahí que sean las que con mayor frecuencia se presentan.

Ante estos problemas de indeterminación y la problemática que genera para el paciente, los laboratorios se ven obligados a realizar las confirmaciones con mayor frecuencia.

La figura 15 se realizó con la finalidad de representar la correlación de la quimioluminiscencia con el Western blot ya que a medida en la que se incrementa el intervalo de concentración se presentan más bandas, importante destacar que en los intervalos de 0.0 – 0.99 y 1.0 9.99 es donde podemos encontrar una gran cantidad de resultados WB indeterminados, anteriormente se discutió las bandas de WB que más aparecían en el caso de los indeterminados p24, p17, p55; en el cuadro 26 se menciona el número de bandas que pueden estar presentes en un WB indeterminado sobresaliendo una o dos bandas. De tal manera que cuando se presente un resultado entre 0.0 – 10 S/CO probablemente podemos obtener un WB como el que se describe en la figura 15 con una o más bandas de las señaladas.

13. CONCLUSIÓN

El método de escrutinio utilizado en el Laboratorio de Referencia Internacional CARPERMOR para el diagnóstico de VIH (ARCHITECT HIV Ag/Ab combo) es confiable ya que obtuvimos un 100% de sensibilidad, 93% de especificidad y un índice de falsos positivos de 7%. Se encontró que existe un patrón entre las bandas presentes en el Western blot y la concentración de la quimioluminiscencia ya que a medida en que la concentración es mayor a 11.0 S/CO el resultado del Western blot es positivo y cuando la concentración es menor a 11.0 S/CO el resultado del Western Blot es negativo o indeterminado de acuerdo a los criterios de la OMS.

De los 109 casos de Western blot indeterminados corresponden en su mayoría a mujeres (34%) en edades reproductivas (20 años - 39 años), se infiere que los cruces antigénicos están relacionados a factor reumatoide, LES, embarazos entre otros padecimientos ya que en estas edades es cuando se comienzan a ser presentes estos padecimientos o estados. Las proteínas víricas implicadas en los cruces antigénicos fueron p55 (30.27%), p24/25 (43.11%) y p17/18 (27.52%).

Finalmente la mayor prevalencia de la infección del VIH se da en los hombres (64%) en edades de (20 años – 39 años) y en las mujeres es menor la prevalencia (29%) tomando en cuenta las mismas edades.

14. REFERENCIAS

- 1.** Levy J. El VIH y la patogénesis del SIDA. México: FCE (INER). 2008.
- 2.** Shors T. Virus: estudio molecular con orientación clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana. 2009.
- 3.** Romero CR. Microbiología y parasitosis humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Médica Panamericana. 2007.
- 4.** Tortora GJ, Berdell R, Funke C, Case L. Introducción a la microbiología. 9a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 2007.
- 5.** Vélez AH, Rojas MW, Borrero RJ, Restrepo MJ. Manual de VIH/SIDA y otras enfermedades de transmisión sexual. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas. 2005.
- 6.** Frankel AD, Young JA. Fifteen proteins and RNA. *Ann. Rev. Bioch.* 1998. 67: 1-25.
- 7.** Carrasco L. El virus del SIDA: Un desafío pendiente. España: Hélice 1996.
- 8.** Rocha GRC, Lozano ZP, Martínez LI. Mecanismos de patogenicidad e interacción parasito hospedero. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2004.
- 9.** A. de QC. Vacunas: Prevención de enfermedades y protección de la salud. Organización Mundial de la Salud. 2004.
- 10.** Granoff A, Webster R. Enciclopedia de Virología. 2ª ed. Memphis: Academic Press. 1999.
- 11.** Cannon PM, Matthews S, Clark N, Byles ED, Iourin O, Hockley DJ, Kingsman SM y Kingsman AJ. Structure-function of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein, p17. *Jvirol.* 1997; 71: 3474-3483.
- 12.** Fiorentini S, Marini E, Caracciolo S, Caruso A. Functions of the HIV-1 matrix protein p17. *Microbiol.* 2006; 29: 1-10
- 13.** Lázaro LE, Escarmís HC. Virus emergentes: La amenaza oculta. España: Sirius 2002.
- 14.** Parham P. Inmunología 2ª ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. 2006.

15. A. EE. The Human immunodeficiency virus: Biology, immunology and therapy. USA: Princeton University Press. 2002.
16. Marks AR, Neill US. The JCI Textbook of Molecular Medicine. India: The American Society for Clinical Investigation. 2008.
17. Schuitemaker H, Miedema F. Immunology and medicine: AIDS Pathogenesis. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 2000.
18. Pilcher CD, Eron JJ, Galvin S, Gay C, Cohen MS. Acute HIV revisited : new opportunities for treatment and prevention. J Clin Invest. 2004; 113(7):937-945.
19. Vigilancia Epidemiológica de Casos de VIH/SIDA en México. Registro Nacional de Casos de SIDA. Actualización 31 de Marzo del 2013 (CENSIDA). Disponible en: http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/RN_1er_trim_2013.pdf Accesado el 12 de Agosto de 2013.
20. Organización Panamericana de la Salud. Pautas para la atención clínica de la persona adulta infectada por el VIH. Washington, DC: OPS, 1999.
21. UNAIDS. AIDS Epidemic Update. Joint United Nations Programmer on VIH/AIDS (UNAIDS), World Health Organization. 2012.
22. Magis RC, Barrientos BH. VIH/SIDA y salud pública manual para personal de la salud. 2ª ed. México: ISBN (CENSIDA, INSP). 2009.
23. Fuentes AX., Castiñeiras L. M. J., Queralto C J. M. Bioquímica Clínica y Patología Molecular. 2ª ed. Barcelona: Reverte. 1998.
24. SSA. Secretaria de Salud. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-2010, Para la prevención y el control de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Diario Oficial de la Federación (DOF). Miércoles 10 de Noviembre de 2010.
25. Caballero OA, Boceta OJ, Luna GJ, Torres MJ, González NA, Millán BF, Valverde GE, et al. ATS/DUE del Servicio Gallego de Salud. España: MAD. 2006.
26. Ausina RV. Moreno GS. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Buenos Aires; Madrid. Médica Panamericana. 2005.

27. Baveja K, Usha, Rewari B.B. Diagnosis and management of HIV/AIDS: A clinician's perspective. 2a ed. New Delhi. 2006.
28. Richard SE, Ochs H, Winkelstein J. Immunologic disorders in infants and children. 5a ed. USA: Elsevier Saunders. 2004.
29. Pachón DJ, Pujol LE, Rivero RA. La infección por el VIH: guía práctica. 2 ed. España: Sociedad Andaluza de enfermedades infecciosas. 2003.
30. García-Campaña, AM, Baeyens WRG, Zhang X, Ales F, Gamiz L. Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo. *Ars Pharmaceutica*. 2001. 42:1; 81-107.
31. García-Campaña AM, Baeyens WR, Chemiluminescence in analytical chemistry. Marcel Dekker, New York, 2001.
32. García RG, Martínez MI. Ventajas del método de quimioluminiscencia frente al de radioinmunoanálisis (RIA). *Vis ciento*. 2009. 1:2; 60-68.
33. Crowe Susan, Jennifer Hoy, John Mills. Management of the HIV-infected patient. 1a ed. USA: Cambridge University Press- 1996.
34. Snell JJS, Supran EM, Tamashiro. Sistema internacional de la OMS para evaluar la calidad de las pruebas detectoras de anticuerpos contra el VIH: resultados de la segunda distribución de sueros. *H. Bol of Saint Panam*. 1994. 116:2; 124-134.
35. López BLJC, Delgado R, García F, Eiros JM, Ortiz LR. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH-1. *EIMC*. 2007. 25:10; 632-638.
36. Argimon PJM. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 2ª ed. Madrid: Harcourt. 2000.
37. Dawson B, Trapp RG. Bioestadística médica. 4ª ed. México: El Manual Moderno. 2005.
38. Landero HR, González RMT. Estadística con SPSS y metodología de la investigación. 1ª ed. México: Trillas. 2006.
39. Ruíz MA. Epidemiología clínica: investigación clínica aplicada. 1ª ed. Bogotá: Médica Panamericana. 2004.

40. Greenberg RS, Flanders WD, Daniels SR, Eley JW, Boring JR. Epidemiología médica. 4ª ed. México: El manual Moderno. 2005.
41. Hernández ML, Evaluación de la presencia de VIH-2 en muestras de pacientes con Western blot indeterminado para VIH-1, Cuautitlán Izcalli: FES Cuautitlán. 2005.
42. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. Microbiol Rev. 1993; 57: 183-289.
43. Manual de salud sexual reproductiva. Ministerio de salud pública y asistencia social. El Salvador. 1999
44. Secretaria de salud; subsecretaria de prevención y promoción de la salud; dirección general de epidemiología; Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica del VIH/SIDA. México 2012.
45. García F, Álvarez M, Bernal C, Chueca N, Guillot V; Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y resistencias a los antirretrovirales. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011; 29(4): 297-307.
46. Centro Nacional para la Prevención y el control de VIH y el SIDA. CENSIDA informa, agosto 2013. Disponible en <http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/atencion/Censidainforma.pdf> Accesado el 12 de septiembre de 2013.