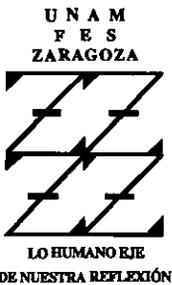
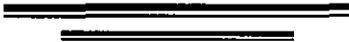


37



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**COMPARACION DE LOS METODOS: VIDAS HIV DUO Y ABBOTT HIV-1/HIV-2
EIA PLUS EN DONADORES DE SANGRE DEL BANCO CENTRAL DE SANGRE
DEL CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA, IMSS.**

290825

T E S I S
Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :

CAROLINA JIMENEZ LOPEZ

México, D.F,

Octubre 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A*gradecimientos a:

1. Biomeriux

Gerente del Depto. de Inmunología
Q. Fabricio Rangel Sánchez

2. Banco Central de Sangre del Centro Medico Nacional La Raza
Enseñanza e Investigación

3. Banco Central de Sangre del Centro Medico Nacional La Raza
Laboratorio

4. Hospital del Sindicato Azucarero
Laboratorio

Al **Q.F.B. Antonino Saenz Prieto** quien revisó éste trabajo, indicándome un sinnúmero de mejoras y formas de clarificar los conceptos.

A la **Q.F.B. Luz del Carmén Mavil Lara** por su apoyo en el desarrollo experimental del presente trabajo.

Al **Q. F. B. Roberto Vázquez Campuzano** por sus observaciones en la elaboración de éste trabajo, así como su gran disposición para compartir sus conocimientos.

A la **I. Q. Teresa Guerra Dávila** por su asesoría en la interpretación de resultados del presente trabajo, así mismo por su calidad humana y entrega al impartir sus conocimientos.

A mi madre y abuela:

Por su apoyo a lo largo de mi vida, porque son parte de mis logros y son fuente de inspiración para continuar con mi superación personal.

A mi esposo:

Por todos los momentos compartidos durante éste periodo de mi formación profesional, que constituyen un estímulo para alcanzar mis metas.

A mi querido Hijo (Misael):

Por las bellas experiencias que me ha regalado, su tolerancia en situaciones complicadas y porque sin saberlo contribuyó a que juntos alcancemos esta meta.

A mis amigos:

Por su aliento y apoyo incondicional, así mismo por los gratos momentos.

Y a todas las personas que de una u otra forma participaron durante la realización del presente trabajo.



INDICE GENERAL

I. RESUMEN.....	2
II. MARCO TEORICO.....	3
II.1 Historia.....	3
II.2 Agente etiológico.....	4
II.3 Vías de transmisión.....	4
II.4 Epidemiología.....	4
II.5 Biología molecular.....	5
II.6 Replicación viral.....	7
II.7 Mecanismos inmunopatogénicos.....	8
II.8 Manifestaciones clínicas.....	10
II.9 Métodos de diagnóstico.....	13
II.10 Tratamiento.....	17
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
IV. OBJETIVO.....	19
V. HIPOTESIS.....	20
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
VII. RESULTADOS.....	38
VIII. ANALISIS DE RESULTADOS.....	40
IX. CONCLUSIONES.....	42
X. GLOSARIO.....	43
XI. REFERENCIAS.....	44



I. RESUMEN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es una manifestación tardía de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) que afecta a muchos países, por ello se considera un problema mundial de salud pública.

Existen dos tipos, uno es el VIH-1 presente en casi todo el mundo y el VIH-2 predominante en el oeste de África.

Las principales vías de transmisión del VIH-1 son: sexual, sanguínea y perinatal. Hasta el momento se cuenta con diversos métodos que identifican directa e indirectamente al virus. La importancia de los métodos en relación con la transmisión del virus por transfusión, se debe a que éstos contribuyen a garantizar que el producto a transfundir no está infectado con el VIH-1, es decir, descartar los productos no idóneos, considerados como fuente infectante.

Luego entonces es conveniente, tener los métodos que reduzcan el período de ventana, minimizando así el riesgo por transmisión sanguínea.

El estudio se realizó en una población de 350 muestras, 87 de ellas son consideradas de alto riesgo de acuerdo a la respuesta en el cuestionario de autoexclusión. Cada muestra se analizó con ambos métodos (VIDAS HIV DUO y ABBOTT VIH-1/VIH-2 EIA Plus) y como pruebas confirmatorias la determinación de antígeno p24 por neutralización y Western-Blot.

Se obtuvo una muestra positiva por ambos métodos; 2 falsos positivos con Abbott VIH-1/VIH-2 EIA Plus; 1 falso positivo con VIDAS HIV DUO. Al realizar el análisis estadístico de resultados con X^2 nos indica que si existe diferencia significativa entre ambos métodos, el resultado depende del método de diagnóstico utilizado.



II. MARCO TEORICO

II. 1 HISTORIA

A principios de la década de los 80's se notifican los primeros casos de lo que actualmente se llama Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), considerado como una manifestación tardía de la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

En 1981 el Dr. Michael S. Gottlieb de la Facultad de Medicina de la Universidad de California y el Dr. F. Siegal del centro médico Monte Sinaí, en la ciudad de los Angeles California, detectan en cinco jóvenes homosexuales neumonía por Pneumocystis carinii, posteriormente se reportan casos de sarcoma de kaposi debido al virus del herpes tipo 8 además de neumonía, en hombres homosexuales de Nueva York y California, se observó una disminución de células T4, de ahí que se presentaran infecciones oportunistas. Para ésta época se creía que afectaba exclusivamente a personas con preferencia homosexual.

En 1983 se sabía que era capaz de transmitirse por vía sanguínea y los casos de recién nacidos infectados, confirman que también se daba por vía perinatal. El Dr. R. Gallo de Estados Unidos denomina al agente causal como virus humano de células T III (HTLV III) o Virus Linfotrópico humano y el Dr. Montagnier en el Instituto Pasteur de Francia lo denomina virus asociado a linfadenopatía (LAV), el análisis se realizó en células provenientes de un nódulo linfático inflamado de un homosexual, observaron que crecía en células T4 pero no en células T8. Por otra parte el grupo de J. Levy en California le llama ARV. Se observa que también se transmitía mediante relaciones heterosexuales (1,3).

Su origen se ha propuesto en la década de los 50's por el análisis de muestras congeladas provenientes de Zaire, aunque oficialmente los primeros casos se reportan en 1981.

En 1985, se comienza a utilizar las pruebas serológicas de detección de anticuerpos en los Bancos de Sangre de Estados Unidos.

En 1986, el Comité Internacional para la Taxonomía de los virus propone que se unifique el nombre, denominándolo VIH-1 en español y HIV-1 para el resto de los países.

Ese mismo año se analizan muestras provenientes de Guinea-Bissau en el Oeste de Africa con cuadro clínico sugestivos de SIDA, por medio del estudio de sondas de DNA se determina la presencia de un virus similar al VIH-1, que inicialmente se le denominó LAV2, SBL6669 y HTLV IV, pero al ser genéticamente diferentes, finalmente por acuerdo se le nombra VIH-2.

En México, en 1982 se detecta el primer caso de SIDA en un varón de 27 años que ingreso al Hospital de Cardiología y Neumología del Centro Médico Nacional.

En 1983, se identifican 4 casos probables de SIDA en el Hospital de Nutrición.

En 1986, se formó el Comité Nacional de Prevención del SIDA (CONASIDA). En mayo del mismo año se hace obligatoria la detección serológica del VIH. Se publica en el diario oficial la Norma oficial que establece la obligatoriedad de realizarse las pruebas de detección, en todos los bancos de sangre.

En 1987, se prohíbe la comercialización de sangre, se fomenta el altruismo, se reportan los primeros cinco casos de VIH, en donadores remunerados, se sabe que los hombres se dedican profesionalmente a la donación en mayor número. Para éste año en México ya se habían detectado 487 casos (3, 9-11).

Entre 1987 y 1993, se establecen los centros estatales de transfusión sanguínea.



II. 2 AGENTE ETIOLOGICO

El Virus de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH), pertenece a la familia Retroviridae, género Lentivirus. Los retrovirus necesitan replicarse necesariamente dentro de una célula, tienen como característica revertir el ciclo de información genética que va del ADN al ARN con ayuda de la enzima transcriptasa reversa que está presente en el núcleo, sintetiza ADN empleando ARN viral como molde. Los Retrovirus se clasifican de acuerdo al tipo de transmisión, rango de hospederos o su morfología; la más utilizada es por sus propiedades biológicas y patogénicas, existen tres géneros: Oncovirus, Lentivirus, Espumavirus.

Oncovirus (HTLVI y HTLVII) producen tumores malignos; Lentivirus (VIH-1 y VIH-2) son asociados a desordenes degenerativos e inflamatorios progresivos; Espumavirus no está relacionado con efecto patógeno en el humano (5, 6).

El virus puede estar dentro de la célula (Provirus) o en forma libre (partícula viral o virión). Fuera de la célula tiene un tiempo de vida media muy corta, unos minutos, es sensible a detergentes comunes y a los desinfectantes, se destruye por calor a 65°C/30 min. Dentro de la célula tiene un tiempo de vida media muy largo, es más infectante, aumenta su capacidad mutagénica (3).

II. 3 VIAS DE TRANSMISION

Se establece que son tres las principales vías de transmisión: sexual, sanguínea y perinatal. De acuerdo a estudios epidemiológicos se observa que los líquidos biológicos como el semen, secreción cervicovaginal, leche materna, sangre y componentes sanguíneos son los predominantes como fuentes infectantes del VIH pero no exclusivos, debido a que existen otras vías de menor frecuencia.

En el caso de la vía sexual aumenta el riesgo de adquirir la infección si están presentes otras enfermedades de transmisión sexual con procesos inflamatorios y ulcerativos.

La vía perinatal, puede ocurrir mediante el cruce a través de la placenta del virus, durante el parto o durante la lactancia(6-8).

La transmisión está determinada por diversos factores, como inóculo, vía de transmisión, factores celulares de parte del huésped y características de la cepa viral, que regulan el progreso del desorden; por ejemplo unas personas pueden infectarse con sólo tener una relación sexual y otras no, es más eficiente la transmisión de hombre a mujer que de mujer a hombre; depende también del estadio en el ciclo menstrual, etc.

II. 4 EPIDEMIOLOGIA

El VIH-1 está presente a nivel mundial y el VIH-2 es dominante en el occidente africano. En México los hombres se contagian por vía sexual(homo o heterosexual) y en menor medida por transfusión sanguínea; en mujeres en un inició fue por vía sanguínea hoy en día es mediante relaciones heterosexuales predominantemente; en menores de 15 años inicialmente se dio por vía sanguínea, actualmente por vía perinatal y en menor medida por vía sexual.



Hasta 1999, del total de casos notificados el 79.7% la transmisión fue por vía sexual; 1.0% por vía sanguínea, de éste porcentaje 0.1 % corresponde a donadores, éste dato no es homogéneo en las diferentes zonas del país; 1.4% por vía perinatal.

La transmisión por vía sanguínea, se dio en gran medida porque inicialmente una tercera parte de la sangre era obtenida de donadores remunerados, además de que no existía una norma o reglamento respecto a los bancos de sangre. Se desconoce el número de personas infectadas, tanto en donadores y receptores pero se estima que 13% del total de casos a nivel nacional se dieron por vía sanguínea (9-11).

Si bien es cierto que ha disminuido la transmisión mediante transfusiones, el riesgo aunque pequeño existe, estrechamente relacionado con el período de ventana, en el cual aún no se producen anticuerpos aunado a que los métodos de tamizaje en donadores sólo identifican anticuerpos.

II. 5 BIOLOGIA MOLECULAR

El VIH tiene como génoma al ácido ribonucleico(ARN), que es capaz de integrarse al ácido desoxirribonucleico(ADN) de la célula huésped. Miden de 80 a 120 nm, constituido por un núcleo, una cápside icosaédrica y una envoltura externa (Fig. 1).

La cubierta esta constituida por una membrana lípidica que contiene asociadas, proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y clase II del huésped, adicionada de aproximadamente 72 glicoproteínas en forma de tachuelas, conformadas por gp120 y gp41 que atraviesan la membrana (VIH-1); las glicoproteínas gp140 y gp36 en el caso del VIH-2. Una segunda envoltura constituida por la proteína p17 que probablemente estabiliza los componentes exteriores e interiores del virión. La nucleocápside está constituida por la proteína p24, ARN y las proteínas p9 y p7; p7 está directamente unido por enlaces de zinc al ARN, dos copias idénticas de ARN que es de cadena sencilla y de polaridad positiva, tiene una longitud de 7-10 kb, teóricamente funcionaría como un ARNm para síntesis de proteínas , pueden estar asociadas varias enzimas preformadas como la transcriptasa reversa, RNAsaH, integrasa y proteasa (5-7).

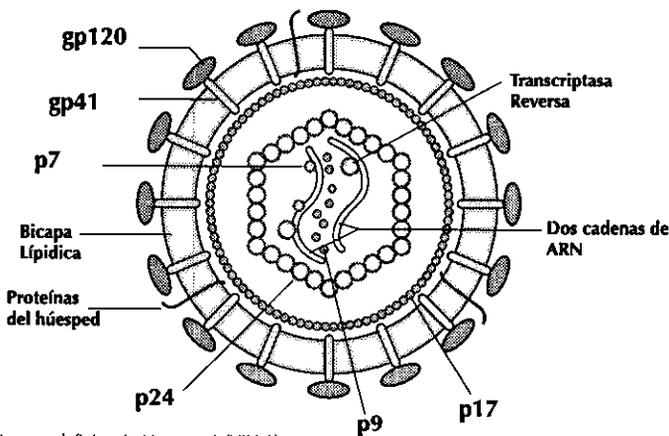


Fig.1 Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana-1 (VIH-1).



El genoma cuenta con tres genes estructurales que determinan los componentes de la partícula viral: env, determinan proteínas de superficie (gp120 y gp41); gag, codifica proteínas correspondientes al núcleo incluyendo p24 y p17; pol, codifica para transcriptasa reversa. Además de tat, rev, vif, vpu, vpr y nef que son genes accesorios (Fig. 2). Todos limitados en ambos flancos por una secuencia llamada Long Terminal Repeat (LTR, Repetidos Terminales Largos) encargado de regular la expresión del resto de los genes así como la integración de los cromosomas, promueve e incrementa el proceso de Transcripción (3-6, 8).

El gen env incrementa el número de mutaciones por acción de la transcriptasa reversa, particularmente en la región variable 3 (V3) descubierta en 1987 en la proteína gp120 conocido como dominio principal, los anticuerpos dirigidos contra esta región tienen actividad neutralizante esto explica la poca efectividad que tiene el sistema inmune, así como su influencia en el desarrollo de una vacuna. El gen tat regula la transcripción del ARNm y transcripción de proteínas; rev mantiene un equilibrio entre las diferentes formas del ARN, otros consideran que determina la ampliación de la replicación viral. Ambos activan la replicación durante la transcripción y después, tat interactúa directamente en la región rica en cisteína facilitando la localización de señales nucleares; vif, vpr y vpu son vitales para la infectividad; nef, induce la endocitosis, reduce la expresión de CD4 en la superficie celular; vpu, únicamente en el VIH1 disminuye la expresión de CD4 por anulación de la degradación de complejos intracelulares en el retículo endoplásmico y al parecer participa en la maduración y liberación de los virus; vif, parece influenciar la síntesis de ADN en la célula huésped, se cree que no está en el virión intacto (4, 8).

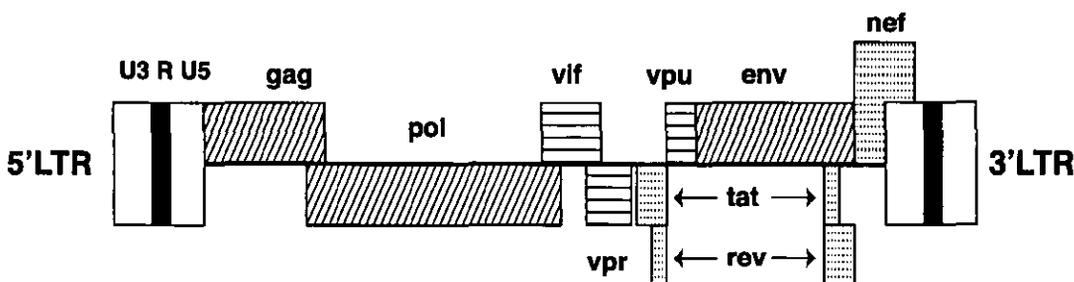


Fig.2 Genes del virus de inmunodeficiencia humana-1(VIH-1).

La enzima integrasa, es necesaria para la unión covalente entre el virus y el ADN celular para formar al provirus, inserta el ADN proviral en el núcleo de la célula huésped. La ribonucleasa H se encarga de degradar una cadena original de ARN para formar la segunda cadena de ADN con ayuda de la enzima Transcriptasa reversa.

El VIH-2, tiene mayor similitud con el virus de inmunodeficiencia en simios (VIS) que con el VIH-1, tienen afinidad por el receptor CD4, hay menor muerte celular, menor formación de sincicios celulares, menor replicación, la organización genómica es similar al VIH-1 excepto vpx, p27 (proteína del core). El gen gag y pol se conservan de ahí que se presenten reacciones cruzadas en algunos ensayos serológicos. Tiene afinidad por el receptor CD4, también se fusiona con la célula huésped, V3 es la región dominante de neutralización. El gen vpx, no interviene en la replicación, facilita la infección en linfocitos y monocitos; nef probablemente incrementa



la replicación en el VIH-2; vpr, facilita la infección en macrófagos; vif involucrado en la infectividad en algunas células; tat, estimula la producción viral y es esencial para la replicación; rev, se acumula en el núcleo(6,7).

La relación entre el VIH-1 y VIH-2 en nivel mutagénico y genético son importantes en el desarrollo de ensayos de diagnóstico, considerando la epidemiología y la historia natural.

II. 6 REPLICACION VIRAL

El primer paso se produce cuando las partículas virales contenidas en la sangre, semen, leche materna, o bien otra fuente infectante entra en contacto con la célula huésped, mediante la unión de la gp120 con el receptor CD4, provocando cambios conformacionales, en tanto que la gp41 interactúa para fijar el virus con la célula. La distribución de los receptores CD4 explica el tropismo del virus, la constante de asociación es de aproximadamente 4×10^{-9} M, esto explica la alta afinidad de la proteína gp120. Los linfocitos tienen mayor cantidad de éste marcador, por lo tanto, tienen mayor probabilidad de infectarse. Al comienzo del estudio del SIDA se pensaba que sólo afectaba a ésta población celular, hoy en día se sabe que también afecta a otras poblaciones celulares que tienen ese receptor como macrófagos, diversas células del sistema hematopoyético, de las mucosas del intestino, endometrio, cerebro, piel, pulmón, epitelio anal y vaginal entre otras. Si bien el receptor CD4 es el principal también se han identificado otros como es el CXCR4, CCR2, CCR5. La ausencia del receptor CCR5 está asociado con una disminución de susceptibilidad al VIH, una delección en éste receptor puede provocar una resistencia natural en algunas personas(12).

La entrada del virus es por fusión, dependiente del pH, pierde su envoltura y entra su genoma al citoplasma de la célula huésped, el ARN se transcribe con ayuda de la transcriptasa reversa a ADN de doble cadena. La integrasa viral ayuda a que éste ADN se integre al genoma al entrar al núcleo de la célula huésped (Provirus) y en cada extremo de la estructura de los genes están limitados por RTL. Se ha propuesto que existe un complejo de preintegración, constituido por proteínas asociadas con ácidos nucleicos virales, localizados en el núcleo. El complejo tiene todas las funciones necesarias para producir viriones, se cree que ayuda a mantener una estabilidad y disminuye la susceptibilidad a las nucleasas.

Después ocurre una transcripción mediada por tat y rev donde se producen ARNm virales de aproximadamente 2.0 kb, que dará lugar a la síntesis de proteínas virales. La transcripción está regulada por RTL. Los productos de los genes gag y pol forman proteínas del core necesarias para que ocurra el ensamble; el gen env contribuye para formar proteínas de envoltura y así se inicie el proceso de maduración en el cual salen viriones capaces de infectar otras células (Fig. 3).

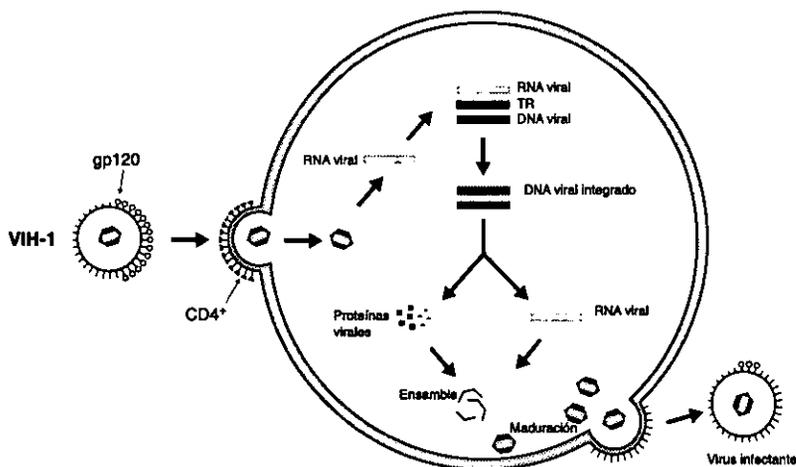


Fig. 3 Ciclo de replicación del virus de inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1).

La replicación se puede mantener activa hasta 24 horas, la síntesis de DNA es completada en 4 horas después de la infección, aproximadamente 1 nucleótido/seg in-vivo, in-vitro 3 nucleotidos/seg (5,6,8).

Los factores reguladores del huésped en la replicación viral son diversos, están influenciados por una gran variedad de citocinas, proteínas de choque, intermediarios de oxígeno reactivo, infecciones microbianas recurrentes, moléculas de superficie celular (activación de células T), diferenciación y activación celular y otras moléculas inmunoreguladoras. Los virus se replican en diversos tejidos, incluyendo sistema linfóide que son lugares de continua replicación, existen células donde se alberga el VIH de forma latente como es el caso del macrófago, que probablemente tengan la función de reservorio del virus, especialmente en cerebro y pulmón. Diversos estudios demuestran que el TNF α está en plasma y Líquido cefaloraquídeo, que da fuerza y mantiene la replicación viral en monocitos y macrófagos. Las interleucinas IL1, IL β , IL6 intervienen en la transcripción del ciclo viral, también participan las interleucinas IL4, IL10, IL13 (6).

II. 7 MECANISMOS INMUNOPATOGENICOS

La infección por el VIH afecta predominantemente al sistema inmune, la característica principal es la depleción de células TCD4, revierte la relación CD4: CD8, se debe sobre todo al tropismo del VIH por las células que tienen ese receptor. Intervienen además diversos factores como son: respuesta inmune específica contra el virus VIH por linfocitos T-citotóxicos, células natural killer, mecanismos autoinmunes, señales celulares inadecuadas, perturbación mediada por un superantígeno, células B, etc.

Los superantígenos estimulan al linfocito T, por la unión a la región variable β del receptor del linfocito T, haciendo más susceptible a la célula para infectarse con el VIH y promoviendo el efecto citopático. Son considerados como tales al citomegalovirus, tuberculosis.



Otras células susceptibles de infección incluyen monocitos, macrófagos, células de la microglía, células de langerhans, células dendríticas foliculares, epitelio del ano y vagina, pulmón, mucosa del colon, etc. El efecto es diferente en cada tipo celular.

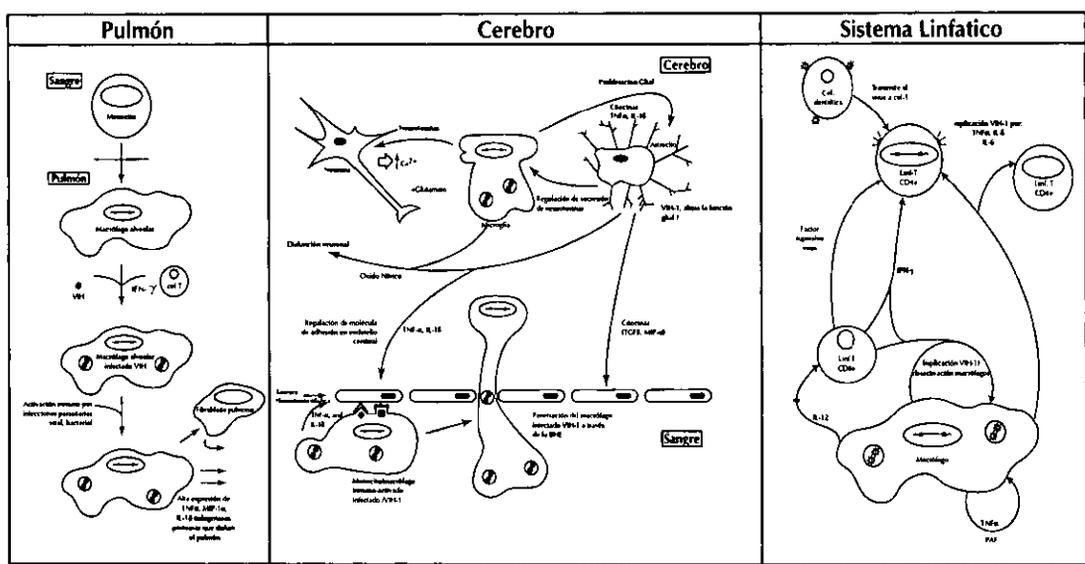


Fig. 4 Mecanismos inmunopatogénicos del virus de inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1) en pulmón, cerebro y sistema linfático, que demuestra el papel de los macrófagos.

Los macrófagos y monocitos actúan como reservorios y pueden contribuir a la patogénesis. Los macrófagos son relativamente resistentes a los efectos citopáticos del VIH, aunque sus funciones suelen estar deterioradas (Fig. 4).

El antígeno de linfocitos humanos (HLA) y $\beta 2$ microglobulina están presentes en la partícula viral, probablemente adquiridas durante la fusión a la célula huésped, cabe la posibilidad de que envía señales inapropiadas a células T activándola, evento necesario para que ocurra la apoptosis (5,6).

$\beta 2$ microglobulina se encuentra en todas las células nucleadas y sirve como cadena principal del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, se elevan sus niveles cuando se afectan éstas células o mueren.

En resumen los efectos citotóxicos son:

- 1) Muerte celular simple. La unión de gp120 y el receptor CD4 provoca una disrupción de la integridad de la membrana, provocando lisis celular. La acumulación de DNA viral no integrado contribuye al daño celular, llevando a la muerte a la célula huésped.
- 2) Formación de sincitios, se presenta una interacción de células infectadas con células que también tienen el receptor CD4, formando células gigantes multinucleadas, mecanismo por el cual se eliminan muchas células CD4 no infectadas, se ha observado en necropsias, particularmente en el cerebro.



- 3) Supresión y modulación de la función inmune por interacción del virus con la célula huésped. Se piensa que los epítomos presentes en la molécula CD4 son enmascarados por la glicoproteína gp120, in-vivo puede existir el complejo con el anticuerpo antigp120, provocando señales inapropiadas celulares.

La apoptosis es un mecanismo normal de destrucción celular programada, para eliminar ciertas clases células que de otra manera serían dañinas para el organismo. Para los linfocitos, una primera señal puede ser generada cuando se unen con una molécula externa, un antígeno específico o un complejo antígeno-anticuerpo. La desventaja en la infección por el VIH es que aún cuando no está infectada la célula la conduce a apoptosis, tanto células CD4 y CD8 que conduce a una depleción de éstas líneas celulares(5).

La respuesta inmune humoral y celular están implicadas en el proceso de infección. La producción de anticuerpos neutralizantes, anticuerpos dependientes de la citotoxicidad celular, células natural killer y respuesta del linfocito Tcitotóxico, sirven como control en etapas tempranas, pero en etapas avanzadas contribuyen a la eliminación de células infectadas o células que tienen ligadas proteínas del VIH (TCD4, células dendríticas foliculares, monocitos, macrófagos y otras), deteriorando el sistema inmune. Aún no está claro si hay activación crónica, pero sí se ha observado hiperactividad de células B, monocitos y macrófagos. Las células inmunocompetentes mantienen un estado activado que conduce a la apoptosis celular.

El sistema inmune inicialmente suprime las variantes del VIH, manteniendo una fase asintomática, pero el efecto sobre la evolución clínica es probablemente mínimo ya que los anticuerpos son específicos para una cepa, al ocurrir múltiples mutaciones el sistema inmune no tiene tiempo de atacar al VIH, causando una depleción en células CD4, una emergente virulencia conduce a una segunda pérdida, durante éste período el tejido linfoides es el mayor reservorio. En los nódulos linfoides periféricos, hay una activa replicación viral en células foliculares dendríticas (Hass y cols. dice que ocurre en la superficie y espacios extracelulares), células TCD4 y macrófagos, asociado a una proliferación de células T y B, causando hiperplasia, de ahí emigran a través de folículos linfoides y a sangre periférica. Al transcurrir el tiempo la carga viral se incrementa en los tejidos linfoides (bazo, nódulos linfoides periféricos, células de peyers, lámina propia e interepitelial), los órganos manifiestan una fibrosis difusa con daño total de la estructura normal, característica de los nódulos linfoides(7,8).

II. 8 MANIFESTACIONES CLINICAS

Cuando ocurre el primer contacto del VIH con el organismo se puede presentar un cuadro semejante a una gripe, el período de incubación puede abarcar de 6 días a 6 semanas, en el cual el individuo aún no produce anticuerpos denominado período de ventana. Este síndrome se caracteriza por fiebre, cefalea, dolor de garganta con faringitis, linfadenopatía generalizada y erupción cutánea. El virus se replica abundantemente, es posible identificarlo en cultivo celular y se identifica al antígeno p24. El período de ventana se caracteriza principalmente porque aún no se producen anticuerpos, que son detectados con los métodos autorizados en nuestro país.

Después comienza un período asintomático que dura de meses hasta 10 años, progresa el número de células T CD4, macrófagos y células dendríticas infectadas, es posible que aparezca



una linfadenopatía generalizada, artralgia, mialgia, alteraciones inflamatorias de la piel, diarrea, pérdida de peso, sudoración nocturna, fiebre, disminución de células CD4, transaminasas elevadas y que se le denomina Complejo Relacionado al SIDA o bien el paciente experimenta buena salud, aunque en algunos los síntomas progresan de tal forma, que el desenlace es fatal (Fig. 5). El progreso del síndrome está influenciado por el inóculo, tropismo, virulencia y tipo de cepa, inducción de sincitios (11).

Durante éste período la replicación es alta, dinámica y continua, ocurre una depleción de células CD4 que deteriora el sistema inmune, favoreciendo la presencia de infecciones oportunistas y otros desordenes. Diversas investigaciones sugieren que durante está fase la medición de la carga viral es un factor de pronóstico del avance del síndrome.

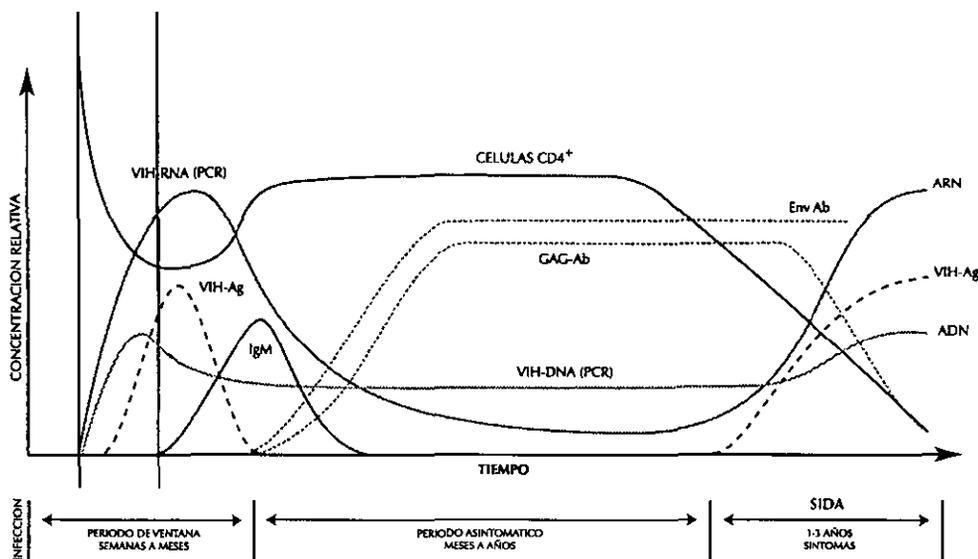


Fig. 5 Evolución de la infección por el VIH-1 y marcadores serológicos.

En una revisión de casos de SIDA, los síntomas iniciales más comunes son: fiebre y sudoración nocturnas, mialgia, que puede estar asociado con un incremento de la enzima creatin-cinasa, artralgia, letargia, persisten por meses hasta aparecer otras manifestaciones clínicas. El diagnóstico se hace basándose en diversas pruebas de laboratorio, presencia de infecciones oportunistas, neoplasias, caquexia (síndrome de desgaste), degeneración del SNC (ver tabla 1). La linfadenopatía axilar, occipital, cervical están involucrados persisten a partir de la segunda semana, de forma paralela con una linfocitosis, también se ha observado esplenomegalia. La evidencia dermatológica es una dermatitis eritematosa sin comezón, maculopapular, simétrica de 5-10 mm de diámetro, afecta tronco, mejillas, aunque también afecta en algunos casos las extremidades, incluyendo palmas y plantas de los pies o ser generalizado, descamación de plantas y palmas, alopecia, y eritema multiforme, ocurren después de los dos meses de la infección (6,8,12).

Ulceraciones mucocutáneas, se presentan en boca, vagina, ano, pene, esófago, redondas u



ovales, delimitadas. Bartelsman, ha observado una descamación parcial del esófago del epitelio escamoso con infiltración de granulocitos.

Los altos niveles de $\beta 2$ -microglobulina, neopterin en líquido cefalorraquídeo sugiere que el Sistema Nervioso Central también está dañado en ausencia de otros síntomas o signos, éstos son considerados como marcadores indirectos que no han probado tener valor diagnóstico. Los síntomas más comunes son dolor de cabeza, dolor retroorbital, exacerbado por el movimiento del ojo y fotofobia. La depresión, cambios de humor, irritabilidad manifiesta un daño cognitivo, persisten por meses.

En el sistema gastrointestinal, se presenta edema faríngeo, náusea, vómito, y diarrea, candidiasis oral; sistema respiratorio, neumonía por *Pneumocystis carinii*, asociado con una depleción de células CD4 (1, 5).

Tabla 1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS ASOCIADOS CON EL VIH.

General: Fiebre, faringitis, linfadenopatía, artralgia, mialgia, letargia, anorexia, pérdida de peso.

Neurológicos: Dolor de cabeza, retroorbital, meningoencefalitis, neuropatía periférica, radiculopatía, neuritis braquial, síndrome de Guillian-Barré, daño cognositivo.

Dermatológico: Dermatitis eritematoso, maculopapular, dermatitis semejante a la roseola infantil, urticaria difusa, descamación, alopecia, ulceración mucocutánea.

Gastrointestinal: Candidiasis oral y orofaríngea, náusea, vómito y diarrea.

Respiratorio: Tos, faringitis.

Neoplasias: Sarcoma de kaposi, linfoma, carcinoma oral y anorectal, otros tumores.

Infecciones oportunistas: *P. carinii*, Toxoplasmosis, Isosporiasis, Criptosporidiasis, Estrongiloidiosis, Leishmaniasis, infecciones por hongos como la *C. albicans*, meningitis por *Criptococcus neoformans*, infecciones por *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. tuberculosis*; citomegalovirus, Herpes simple, virus de Epstein Barr, Salmonelosis, Shigelosis.



II. 9 METODOS DE DIAGNOSTICO

En 1984, se descubrieron los primeros ensayos de utilidad para el diagnóstico del VIH-1, los ensayos detectan directa o indirectamente la presencia de la infección por VIH-1. Los primeros detectan al virus en cultivos de tejido, desafortunadamente son imprácticos y tienen poca sensibilidad el riesgo de resultados positivos por contaminación existe. Después los métodos se encaminan a detectar anticuerpos que produce el huésped. 1990, se identifican con el método de ELISA, anticuerpos contra VIH-1 y VIH-2 de forma simultánea, aunque el método es incapaz de distinguir entre uno y otro.

Los métodos más comunes que se realizan son: Ensayos inmunoenzimáticos (EIA) y Western-Blot(WB), que no requieren un trabajo directo con el virus, son seguros, limitados por la producción de anticuerpos y ausencia de reacciones cruzadas con anticuerpo. Los métodos pueden clasificarse en los siguientes grupos: 1) Técnicas de cultivo viral; 2) Detección de anticuerpos; 3) Detección de Antígenos; 4) Detección del genoma viral; 5) Ensayos que evalúan la Respuesta Inmunológica. Seis años después se desarrollan métodos que detectan productos de la proteína viral y amplificación de fragmentos de ARN y ADN, cuando existe duda aún con los métodos anteriores se realiza el cultivo viral(8, 12).

TECNICAS DE CULTIVO

El cultivo en células mononucleares de sangre periférica, es positivo cuando se detecta la enzima transcriptasa reversa o presencia del antígeno p24, son positivos de un 95-99% cuando verdaderamente está infectado el paciente; o bien se realiza cuantitativamente, por medio de diluciones.

Otra forma de evaluar los cultivos es por inmunofluorescencia o por identificación del efecto citopático.

ENSAYOS QUE DETECTAN ANTICUERPOS

Los primeros anticuerpos que se detectan son IgM dentro de las dos semanas de ocurrida la infección, IgG se detecta de 2-6 semanas después de alcanzar un pico o nivel máximo que declina a los tres meses aproximadamente. IgM está dirigido contra proteínas del gen gag, env, pero los métodos carecen de especificidad y reproducibilidad. Durante la fase temprana se pueden detectar anticuerpos contra las proteínas: p55, p24, p8, p66, p51, gp120, gp160 y gp41.

Dentro de las pruebas de tamizaje de detección de anticuerpos tenemos el método de ELISA. El método fue desarrollado por dos equipos de trabajo casi al mismo tiempo en 1971(Engvall y Perlmann en Suecia y el de Van Weemen y Shuur en Holanda). Existen los siguientes tipos de ELISA: Competitivo, Captura de antígeno, Sandwich, Indirecto, entre otros (5,8, 12).

Entre 1983 y 1984 se determina la utilidad en la detección de anticuerpos contra el VIH. En 1985, es aplicado el método de ELISA para el diagnóstico del VIH-1. Inicialmente los ensayos llamados de primera generación utilizaban lisados virales; los de segunda generación antígenos recombinantes; tercera generación, utilizan péptidos sintéticos; cuarta generación, emplean péptidos sintéticos y antígenos recombinantes y algunos tienen la capacidad de detectar en



forma simultánea al antígeno p24 y al anticuerpo(14-16).

La variabilidad del VIH-1 representa un reto para ensayos de cuarta generación que detectan al antígeno. Tersmette y cols. reportan la poca eficacia del uso de anticuerpos monoclonales para detectar al antígeno p24, de ciertos subtipos, por ejemplo, el subtipo O. Sin embargo, de acuerdo a evaluaciones del método VIDAS HIV DUO y HIV Combi, detectan a éste subtipo aún en altas diluciones. Particularmente no se observan reacciones cruzadas que ocurren en el embarazo, infección primaria por citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, no se incrementan los resultados falsos positivos, respecto a los que ocurren en los métodos de tercera generación. Los beneficios están en función de la seroprevalencia y tiempo de seroconversión, para decidir el empleo de éstos métodos (15, 16).

ELISA, el uso de éste método es analizado entre 1983 y 1984, es aplicado extensamente en 1985, utiliza proteínas provenientes de cultivo de tejido o a través de tecnología recombinante, los antígenos solubles son colocados en el soporte adecuado, al añadir el suero si está presente el anticuerpo se forma el complejo antígeno-anticuerpo, el complejo es detectado con un anti-anticuerpo humano marcado con una enzima, al añadir un sustrato se produce color, la intensidad de color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente.

En 1990, se determina métodos viables para el diagnóstico de VIH-2 y en 1992 métodos combinados que detectan anticuerpos contra VIH-1 y VIH-2, el método de Western Blot incorpora gp36 únicamente para VIH-2.

Pueden presentarse un resultado falso negativo, cuando se forman complejos antígeno p24-anticuerpo a las pocas semanas de adquirida la infección(3, 5).

WESTERN- BLOT es el método suplementario o de confirmación que se utiliza en mayor porcentaje cuando se tiene una prueba de tamizaje positiva. El método es desarrollado por Renart y colaboradores, Towbin y asociados en 1979, revolucionario por detectar proteínas por separado, la migración depende del peso molecular a diferencia del sistema PAGE-SDS que depende de la carga y el peso molecular. En éste caso las proteínas específicas determinan la presencia de anticuerpos contra el VIH-1, los antígenos son separados electroforéticamente, los de alto peso molecular emigran a la parte superior y los de bajo peso molecular a la parte inferior, se transfieren en papel de nitrocelulosa, cuando se incuban con el suero si esta presente el anticuerpo, se forma el complejo antígeno-anticuerpo, se detecta con anti-anticuerpo humano marcado con una enzima. La aparición de bandas indica unión antígeno-anticuerpo, la interpretación se realiza según las indicaciones del método. En general, el criterio es que aparezcan 2 ó 3 bandas de las regiones gag (p55, p24,p17), pol (p66, p51 y p31), env (gp160, gp120 y gp41).

RIPA(Radioinmunoprecipitación), requiere mayor tiempo de realización, utiliza aminoácidos radiomarcados, añadidos cuando ocurre la replicación viral(35 S-metionina, 35S-cisteína). Los antígenos marcados reaccionan con los anticuerpos del suero formando complejos inmunes, es considerado muy específico y sensible. Sin embargo, su utilidad está limitada por el uso de material radioactivo, se utiliza como método de referencia e investigación en algunos laboratorios comerciales, o bien cuando se dificulte establecer el diagnóstico.



INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA, las células infectadas con el VIH son marcadas, y colocadas en una fina capa en un portaobjetos, se incuban con el suero, la unión antígeno-anticuerpo se detecta con isotiocianato de fluoresceína, se evalúa el número de células, intensidad del color y coloración patrón. Detecta IgM durante la infección aguda, requiere de mucha experiencia, mayor tiempo en su realización, y como método de rutina es poco utilizado.

OTROS

Un método alternativo es el de aglutinación en látex, que usan perlas de poliestireno cubiertas con proteínas recombinantes de VIH, en presencia de anticuerpos aglutinan, es útil en zonas endémicas, pero en zonas con bajo índice de infección se requiere de otro método.

Aglutinación autóloga de células rojas, se utilizan anticuerpos monoclonales de ratón contra glóbulos rojos humanos conjugados con una proteína sintética gp41 del VIH. Al añadir la sangre completa, si está presente el anticuerpo-gp41 se produce aglutinación rápidamente, a los pocos minutos.

La determinación de anticuerpos IgG en saliva con un método de ELISA, tiene una sensibilidad y especificidad similar al que utiliza muestra de sangre. La FDA aprobó un método en el que se extrae el líquido crevicular, se transporta en un contenedor con preservativo antibacterial mientras se procesa. En orina, es similar al método que utiliza suero, aunque existe mucha controversia sobre su aplicación(12).

DETECCION DE ANTIGENO p24

Se mide el antígeno p24 libre presente en plasma o en sobrenadante de cultivo celular. Aunque está presente en todos los estadios de la infección predomina en la etapa temprana y avanzada del síndrome. Se detecta a los pocos días de ocurrida la infección, su aparición es transitoria y desaparece cuando se desarrollan los primeros anticuerpos, cuando esto sucede se cree que se forman complejos antígeno p24 y anti-p24, disminuyendo la cantidad de antígeno presente, a éste período se le llama período de ventana. En etapas iniciales se encuentra en cantidades de ng/mL, después no está presente en meses o años, reapareciendo cuando existe una severa disfunción, incremento en la replicación. Otra dificultad es que la cantidad no es uniforme en todos los pacientes, dificultando su diagnóstico. El período de ventana varía de entre 10.2 y 27.4 días según la vía de transmisión, si se emplea un método que detecte al antígeno p24 se reduce de 9.4 a 17.4, de acuerdo al método de análisis. En general no se utiliza por razones de costo-beneficio, para el caso de la vía de transmisión sanguínea, la incidencia es baja, pero el riesgo residual persiste. En el caso de Estados Unidos el riesgo residual es de 1/493 000 al realizar la detección del antígeno p24 el riesgo es de 1/676 000 unidades de sangre, de adquirir la infección por el VIH(4,5,12).

Se utiliza ELISA de sandwich, los anticuerpos son colocados en placas de microtitulación, luego de la unión del antígeno presente en el suero, se añade una Inmunoglobulina ligada a una enzima. Es revelada por adición de un sustrato, el producto es medido espectrofotométricamente; el uso de anticuerpos monoclonales incrementa la sensibilidad substancialmente, pueden detectarse de 7-10 pg/mL.

Al realizar una hidrólisis ácida se aumenta la sensibilidad, por el rompimiento de los complejos



antígeno p24-anticuerpo liberando al antígeno, aunque después del período de seroconversión puede no detectarse el complejo disociado, se reduce la cantidad de antígeno p24, evidente en el método de neutralización. Se trata con glicina y se incuba a 37°C/1 h, esta en estudio el método para aumentar la sensibilidad, especialmente útil para el diagnóstico de VIH en infantes en período perinatal, útil para el seguimiento de la terapia retroviral. La precipitación con polietilenglicol, es útil en investigación, aumenta la sensibilidad de un 38-59%.

REACCION EN CADENA DE POLIMERASA(PCR)

Introducida en 1980, amplifica pequeñas cadenas de ADN, por una serie de ciclos de replicación, cada ciclo consiste en una desnaturalización a 95°C, seguido de la unión de iniciadores o cebadores a 55-60°C y finalmente un período de extensión a 72°C. La duración de cada ciclo dura de 1-3 min, en cada ciclo la región de ADN es duplicada, usualmente de 20-30 aminoácidos. Puede amplificarse ADN proviral, ARN génomico, ARNm. El gran problema es su sensibilidad, desarrollada correctamente es muy útil, pero la contaminación de los reactivos, ADN o ambos puede causar falsos positivos, aún con el personal más experimentado, lo que limita su uso en la práctica clínica.

PCR cuantitativo, para cuantificar ADN proviral y ARN génomico, previamente son amplificados y los productos son comparados con una curva estándar. Está en estudio el uso de marcadores sofisticados para el estudio de la dinámica de replicación in-vivo.

LINFOTIPIFICACION (CD4 / CD8 / CD3)

CD3, CD4, CD8, son marcadores de superficie celular de utilidad para ver el estado que guarda el paciente infectado por el VIH-1. CD3 está presente en todos los linfocitos del humano; CD8, presente en los linfocitos T citotóxicos; CD4 es un marcador que induce reacciones inmunológicas, al interactuar con el complejo MHC II, se liberan citocinas que activan e incrementan la respuesta inmunológica. Se plantea que existe un equilibrio entre las células que tienen estos marcadores en condiciones normales.

El conteo de células CD4, interviene en la respuesta primaria de la infección, puesto que es el sitio de unión con el virus, a través del curso de la infección, disminuye el número de linfocitos CD4 asociados con la aparición de infecciones oportunistas y malignidades. CD4 y CD8 son medidos utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra glicoproteínas de superficie. Los anticuerpos monoclonales son marcados con compuestos fluorescentes, detectados con la luz que pasa a través de la muestra, utilizando citometría de flujo. El número de células CD4 es igual al conteo de células blancas por el % de linfocitos por el % de células CD4. Los valores normales van de 500 a 1600/ mm³ en adultos 40-70%.

El número de CD4, de acuerdo a la CDC (Centro de control de enfermedades) sirve para establecer el estadio de la enfermedad: valor mayor a 500 cel / mm³, categoría 1; de 200 a 500 cel / mm³, categoría 2; menor a 200 cel / mm³, categoría 3.

Otra forma de evaluación clínica del paciente es considerar el cociente CD4 / CD8 que en controles normales el cociente tiene un valor de 0.5 a 2 (5-8).

β2 MICROGLOBULINA

Cuando existe activación celular mononuclear, destrucción celular, un nivel mayor de 3 mg/L está asociado con el progreso de la infección, un valor mayor de 5 mg/L están presentes infecciones oportunistas o sobreviene la muerte. Desafortunadamente es poco específico como marcador y con poco valor predictivo para evaluarse en la práctica clínica. Los métodos que se utilizan son: Inmunoensayo y radioinmunoensayo .

NEOPTERINA

Producida durante el metabolismo de guanosina trifosfato incrementa la actividad celular de los monocitos y macrófagos, después de la activación del Interferonδ , se mide por Cromatografía líquida de alta resolución o por Radioinmunoensayo en suero u orina. Un nivel mayor de 5 ng/mL son seropositivos asintomáticos, no tiene suficiente valor predictivo(5).

HISTOPATOLOGIA

Las biopsias de nódulos indican una disminución en el recuento de células con receptor CD8, existe infiltración folicular, activación de centros celulares, se detectan las proteínas gp120, gp160, linfocitos foliculares e interfoliculares, células endoteliales y dendríticas reticulares, existe hiperplasia folicular, el infiltrado alrededor de los vasos sanguíneos contiene células CD4 y ocasionalmente p24, esto sugiere que el prúrito está mediado por los linfocitos T dirigido contra células de Langerhans infectadas por el VIH.

METODOS UTILIZADOS EN MEXICO

En nuestro país de acuerdo a la NOM-010-SSA2-1993 Para Prevención y Control del VIH, están consideradas dos tipos de prueba: Tamizaje, detección de anticuerpos anti-VIH en suero o plasma (ELISA y Aglutinación); Suplementarias que confirman la presencia de Anticuerpos en suero o plasma (Western-Blot, RIPA); Adicionales como cultivo viral, determinación del antígeno viral o reacción en cadena de la polimerasa para determinar el ARN o el ADN proviral (18, 19).

II. 10 TRATAMIENTO

Son seis diferentes compuestos incluyendo nucleótidos y no nucleósidos de la enzima Transcriptasa Reversa; inhibidores de proteasa, demuestran que reducen el período de vida media del virus. Durante el tratamiento la carga viral es relativamente estable por período de semanas a meses, después declina el nivel de virus circulante, en otros aumenta inevitablemente. La viremia es inversa al número de células CD4+, el incremento en niveles de ARN está asociado con la presencia de mutantes resistentes al tratamiento. El futuro está quizá en detener la replicación del virus.



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SIDA es una de las enfermedades que ha afectado a México al igual que a otros países del resto del mundo con repercusiones que rebasan al área de la salud, como es el aspecto económico, social, psicológico, ético y político. En nuestro país afecta en mayor proporción a personas de entre 25 a 44 años de edad, estamos hablando de personas en edad productiva y reproductiva, siendo la vía sexual la principal vía de transmisión, sin dejar de considerar la vía de transmisión sanguínea y perinatal.

Se estima que del total de casos de SIDA en adultos aproximadamente el 13% adquirieron la enfermedad por vía sanguínea. Sin embargo, de acuerdo a los lineamientos que se establecen en la NOM-SSA3-93 para la disposición de componentes sanguíneos, la prevalencia de la infección por esta vía ha descendido en los últimos dos años de 3.7% a 2.7%.

El riesgo de adquirir el VIH por el uso de componentes sanguíneos persiste debido a que en las pruebas de escrutinio autorizadas para donadores de sangre sólo detectan la presencia de Anticuerpos. Dentro de las posibles causas tenemos: donadores que estén dentro del periodo de ventana, en el cual no hay producción de anticuerpos. Este periodo abarca de 0 a 8 semanas, durante éste lapso se ha identificado la presencia del antígeno p24 en muchas personas infectadas con el VIH1. Se ha discutido mucho sobre el costo-beneficio de implementar como método de rutina en Bancos de Sangre, la detección del Antígeno p24 que aparece en etapas tempranas de la infección y aún cuando en México no se realiza, en otros países si se ha trabajado con diversos ensayos, llamados de cuarta generación que reportan una especificidad y sensibilidad similar a los de tercera generación (9-11).

Es importante considerar que cada individuo que requiera sangre y/o sus componentes debe tener la seguridad de que el producto a recibir no cause daño a su salud. Por tal motivo se deben contar con métodos de laboratorio que sean capaces de detectar al Antígeno p24 y Anticuerpos en etapas tempranas de la infección por VIH y así minimizar el riesgo de transfundir sangre y/o componentes en período de seroconversión, que pudiera infectar al receptor.

En nuestro país se emplean los métodos de ELISA y Hemaglutinación para la detección única de anticuerpos. En éste trabajo se pretende comparar un nuevo método que detecta en forma simultánea al Antígeno p24 y Anticuerpos anti-VIH1/VIH2 (VIDAS HIV DUO), con el método de ELISA convencional (ABBOTT HIV1/HIV2 EIA Plus de tercera generación).



IV. OBJETIVOS

GENERAL:

Comparar el método de ELISA convencional (ABBOTT HIV1/HIV2 EIA PLUS) y el método de VIDAS HIV DUO(HIV4) como pruebas de escrutinio en muestras de donadores de sangre del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional La Raza (CMNR), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

ESPECIFICOS:

1. Realizar la detección serológica con los métodos VIDAS HIV DUO y con ABBOTT HIV-1/ HIV-2 EIA PLUS.
2. Determinar la presencia del Antígeno p24 para las muestras que resulten positivas con el método de VIDAS HIV DUO.
3. Realizar la prueba confirmatoria de Inmunoelectrotransferencia (Western-Blot) a las muestras que resulten positivas.



V. HIPOTESIS

Al realizar la detección serológica con el método VIDAS HIV DUO (ensayo de cuarta generación) en muestras de donadores de sangre que acuden al Banco Central de Sangre del CMN La Raza, será mayor la frecuencia de casos positivos que cuando se realiza la detección serológica con el método de ABBOTT HIV-1/HIV-2 EIA PLUS (ELISA convencional).



VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

A. LUGAR DONDE SE REALIZARA EL ESTUDIO.

El estudio se realizará en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional La Raza IMSS, con muestras sanguíneas de donadores de sangre.

B. DISEÑO

1. Tipo de estudio: Transversal, Observacional, Prolectivo, Descriptivo.
2. Grupo de estudio: Donadores de sangre que acuden al Banco Central de Sangre del CMN La Raza, IMSS.

CRITERIOS DE INCLUSION

I. Muestras que cumplan con los criterios que establece la NOM-SSA3-1993 (19).

- Tener entre 18 y 65 años de edad.
- Estar sano.

II. Muestras de donadores sanguíneos con riesgo de adquirir la infección por el VIH que se autoexcluyan, mediante el cuestionario de autoexclusión proporcionado antes de la recolección.

CUESTIONARIO

- | | | |
|--|-------|-------|
| 1. ¿Te has inyectado por las venas?..... | SI() | NO() |
| 2. ¿Además de la pareja sexual fija, has tenido relaciones sexuales o has hecho el amor con otras personas en los últimos doce meses?..... | SI() | NO() |
| 3. ¿Has hecho el amor con personas que ejerzan la prostitución, en los últimos doce meses?..... | SI() | NO() |
| 4. ¿Tienes o has tenido relaciones homosexuales?..... | SI() | NO() |
| 5. ¿Tu pareja ha tenido o mantiene relaciones sexuales con otra (s) persona (s), en los últimos doce meses?..... | SI() | NO() |
| 6. ¿Alguna vez te has dedicado a la prostitución?..... | SI() | NO() |
| 7. ¿Has hecho el amor con personas que son bisexuales?..... | SI() | NO() |
| 8. ¿Has hecho el amor en los últimos doce meses con personas que padezcan hepatitis, sífilis, SIDA?..... | SI() | NO() |
| 9. ¿Consideras que tu sangre es segura y puede ser transfundida a un enfermo?..... | SI() | NO() |



CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

I. Muestras que no cumplan los criterios que establece la NOM-SSA3-1993 (19).

II. Muestras lipémicas e ictericas.

Los sujetos con mayor probabilidad de adquirir la infección por el VIH que son rechazados:

1. Bisexuales.
2. Más de una pareja sexual.
3. Homosexuales masculinos.
4. Heterosexuales con varios compañeros sexuales.
5. Prostitución
6. Farmacodependientes que utilizan la vía intravenosa.
7. Hemofílicos y Politransfundidos.
8. Exdonadores remunerados.
9. Expresidarios o con antecedentes de enfermedades mentales.
10. Compañeros sexuales de personas infectadas con el VIH
11. Antecedentes de Hepatitis.
12. Positividad en marcadores serológicos para el virus B ó C de la hepatitis o ambos.
13. Manifestaciones clínicas o patológicas asociadas o no a enfermedad por el VIH:

- Cuadro sugestivo de infección aguda por el VIH
- Pérdida involuntaria de peso mayor al 10% del peso corporal habitual en un lapso de 6 meses o menor.
- Fiebre, diarrea, odinofagia, o astenia con duración igual o mayor de un mes.
- Candidiasis orofaríngea, vulvovaginal o persistente, o con mala respuesta al tratamiento.
- Herpes zoster, dos episodios distintos que abarquen más de un dermatoma.
- Herpes simple, mucocutáneo de más de un mes de duración.
- Encefalopatías, síndromes demenciales, neuropatías periféricas o mielopatías.
- Displasia cervical moderada o grave, enfermedad pélvica inflamatoria o absceso tubo-ovárico.
- Púrpura trombocitopénica.
- Tuberculosis extrapulmonar.
- Angiomatosis bacilar.
- Listeriosis.

C. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se estudiará una población de 350 muestras sanguíneas, cada muestra será analizada por ambos métodos. Calculado con el paquete computacional Epi Info versión 6.01, para una población de 72 000 donadores anuales que acuden al Banco Central de Sangre del CMN La Raza, una frecuencia del 0.22, intervalo de confianza del 95 %.



D. DEFINICION DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO

Variable Independiente: A) Método de VIDAS HIV DUO.
B) Método de ELISA convencional.

Variable Dependiente: A) Resultado de VIDAS HIV DUO.
B) Resultado de ELISA convencional
(ABBOTT HIV-1/ HIV-2 EIA PLUS de Tercera generación).

E. PROCEDIMIENTO DE DONACION

1. Registro del Donador.
2. Toma de muestra para análisis requeridos en el examen médico.
3. Signos vitales y somatometría: Presión arterial, Temperatura, Peso, Talla.
4. Examen Médico.
5. Elaboración de papelería.
6. Sala de donación.
7. Comedor.
8. Certificación de la Donación.

F. MATERIAL

1) **Material biológico:** Suero.

2) **Material de laboratorio:**

- Cristalería:
 - Pipetas graduadas de 1mL, 2mL
 - Probeta graduadas de 100, 250 y 500 mL
 - Pipeta pasteur
- Material diverso:
 - Pipetas de 20 μ L, 50 μ L, 150 μ L, 200 μ L, 300 μ L
 - Guantes de látex
 - Aplicadores
 - Pinzas no metálicas o dispensador de esferas
 - Papel filtro
 - Agua destilada
- Soluciones:
 - Acido sulfúrico 1N.
 - Hipoclorito de sodio.

3) **Equipo:**

- Centrífuga (sol-bat J-300).
- PPC (Centro paralelo de procesamiento) Commander
- Agitador tridimensional o rotativo.
- Biomeriux Vitek System s/n DASA 3/39



G. DESCRIPCION DE LOS METODOS

I. VIDAS HIV DUO

El principio de la prueba asocia dos reacciones inmunoenzimáticas a una detección final en fluorescencia (ELFA).

Reacción 1. Detección de inmunoglobulinas G anti-VIH1 (también las del subtipo grupo O) y anti-VIH2.

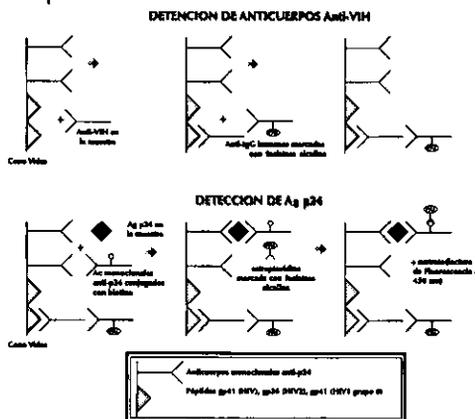
Después de una etapa de dilución, la muestra es aspirada y expulsada varias veces de la parte inferior del cono. Esta operación permite a las IgG anti-VIH1 de la muestra unirse a los péptidos de síntesis gp41 y/o subtipo O y/o gp36 fijados en el cono.

Los componentes no ligados, son eliminados mediante lavados. El conjugado anti-IgG humanas marcado con fosfatasa alcalina se incuba ahora en el cono, en el cual se fija a las IgG anti-VIH. Etapas de lavado posteriores eliminan el conjugado no fijado.

Reacción 2. Detección del antígeno p24.

La muestra previamente diluida y los anticuerpos de conejo anti-p24 biotinilados son aspirados y expelidos en el cono. Durante la incubación el virus es lisado y los antígenos p24 liberados se unen por un lado a los anticuerpos (anti-p24) monoclonales de ratón fijados a la parte superior del cono y por otro lado a los anticuerpos anti-p24 biotinilados. Los componentes no fijados son eliminados mediante lavados. El complejo así formado se revela mediante estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, cuyo exceso se elimina mediante lavados.

En el curso de la etapa final de revelado, el sustrato (4-metil-umberil fosfato) se aspira y expelle en el cono. La enzima presente en el conjugado cataliza la reacción de éste sustrato en un producto (4 metil umbeliferona), midiéndose la fluorescencia emitida a 450 nm. Esta es proporcional a la presencia de IgG anti-VIH y/o antígeno p24 presente en la muestra. Al final del ensayo, los resultados son calculados automáticamente por el VIDAS en relación a un estándar, y posteriormente impresos.



La reacción 1 está realizada en la parte baja del cono, la reacción 2 en la parte alta. La etapa final de revelado se hace de forma simultánea en las dos partes.



El cono de uso único sirve a la vez de fase sólida y de sistema de pipeteo, los demás reactivos, listos para su uso están distribuidos en el cartucho. Todas las etapas del ensayo se realizan automáticamente en el aparato.

El cono está sensibilizado al momento de la fabricación con tres péptidos sintéticos (1 péptido env VIH1, gp41 + 1 péptido env VIH2, gp36 + 1 péptido específico VIH1 grupo 0) y tres anticuerpos monoclonales anti-p24 de los utilizados para VIDAS HIV p24. Los péptidos permiten la captura de los IgG anti-VIH1 y anti-VIH2, y los anticuerpos monoclonales del antígeno p24.

Conservación. Conservar el kit VIDAS HIV DUO a 2-8°C, no congelar. El indicador del deshidratante de los conos debe ser azul. Si vira al rosa, no usar los conos de esta bolsa.

Limitaciones.- No detecta IgA, ni las IgM anti-VIH, no ha sido validado para el uso de fluidos como la saliva, orina, LCR. Se prohíbe mezclar sueros.

Muestra. 200µL de Suero o plasma humano (utilizando EDTA, citrato, heparina de litio, gel de heparinato de litio).

Las muestras que contienen partículas deberán centrifugarse a 1500 rpm/ 10 min. pueden conservarse de 2-8°C, 48 horas como máximo, de lo contrario congelar a -20°C, realizar sólo una congelación. No descomplementar las muestras.

Calibración. Se realiza cuando llegue un nuevo lote, se introducen los datos de calibración en el sistema con ayuda de la tarjeta (ficha de especificaciones), incluida en cada equipo, antes de comenzar el ensayo, es posible introducir las especificaciones de forma manual o automática gracias a la tarjeta. Las especificaciones se introducen sólo una vez para cada lote. Para que el sistema pueda verificar los valores del control, se debe identificar el control positivo como C1, el control negativo por C2 y el estándar por S1 analizado por duplicado.

El valor del estándar debe estar comprendido en el intervalo de RFV "Valor de Fluorescencia Relativa" fijado, si no la medida no será memorizada; en éste caso, repetir una calibración.

TECNICA

1. Sacar el kit de la nevera. Dejar a temperatura ambiente al menos 30 minutos.
2. Sacar del kit un cartucho HIV4 y un cono HIV4 para cada muestra, control o estándar a utilizar. Verificar que la bolsa de los conos está bien cerrada después de su empleo.
3. Colocar el cartucho y el cono HIV4 sobre la bandeja de preparación VIDAS.
4. Crear la lista de trabajo: introducir en el teclado los datos correspondientes al paciente y al test (código HIV4). Teclar "HIV4" para introducir el código e indicar el número de determinaciones a efectuar. Si un estándar debe analizarse, introducir S1 para la identificación de la muestra. El estándar debe analizarse por duplicado. Si el control positivo debe analizarse, introducir C1 para la identificación de la muestra. Si el control positivo debe analizarse, se identificará por C2.
5. Homogenizar en el vortex las muestras, el calibrador y/o los controles.



6. Distribuir exactamente 200 μ L de muestra, estándar o control en los pocillos de muestra de los cartuchos.
(Nota: las muestras y los controles se analizarán una sola vez).
7. Colocar en el VIDAS los conos y los cartuchos en las posiciones indicadas en la pantalla.
8. Iniciar el análisis. Todas las etapas se generan automáticamente por el sistema. Los resultados se obtienen en 100 minutos aproximadamente.
9. Eliminar los conos y cartuchos utilizados en un recipiente que corresponde a desechos biológico-infecciosos.

INTERPRETACIÓN

Los resultados se analizarán automáticamente por el sistema informático. El sistema efectúa dos lecturas de fluorescencia en la cubeta de lectura para cada uno de los ensayos. La primera lectura tienen en cuenta el ruido de fondo debido a la cubeta y al sustrato. La segunda lectura se efectúa después de la incubación del sustrato en el cono. El cálculo de RFV es el resultado de la diferencia entre estas dos lecturas, apareciendo sobre la hoja de resultados.

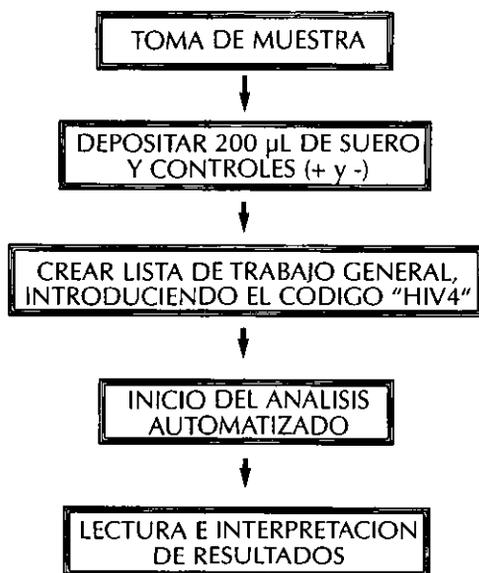
La RFV (Valor de Fluorescencia Relativa) obtenida para el paciente es interpretada por el sistema VIDAS de la siguiente manera:

Valor de la prueba = $RFV_{\text{paciente}} / RFV_{\text{estándar}}$.

Interpretación: Valor \leq a 0.25: Negativo.

Valor \geq a 0.35: Positivo.

DIAGRAMA DE FLUJO (VIDAS HIV DUO)





II. ELISA CONVENCIONAL (ABBOTT HIV-1/ HIV-2 EIA PLUS de Tercera generación)

El ensayo ha sido diseñado para detectar anticuerpos IgG e IgM anti-VIH1 y anti-VIH2. Utiliza proteínas virales obtenidas mediante tecnología de ADN recombinante y péptidos sintéticos que corresponden a las proteínas virales.

Principio.- El suero o plasma humanos se diluye en un diluyente de muestra y se incuba con una perla de poliestireno recubierta de proteínas recombinantes env y gag de VIH1 y env de VIH2. Si la muestra contiene anticuerpos anti-VIH, éstos reaccionan con antígenos que recubren la esfera. Después de la aspiración de materiales no unidos y del lavado de esferas, las inmunoglobulinas humanas específicas que han quedado unidas a la fase sólida se detectan incubando el complejo esfera-antígeno-anticuerpo con una solución que contiene proteínas recombinantes gag y env de VIH1, proteína recombinante env de VIH2 y un péptido sintético de env VIH1 marcados con peroxidasa de rábano picante (HRPO).

Se aspira luego el conjugado enzimático no unido y las esferas se lavan. A continuación, se añade a las esferas una solución de o-fenilendiamina (OPD) que contiene peróxido de hidrógeno. Después de la incubación, desarrolla un color amarillo-anaranjado, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de anti-VIH1 y o anti-VIH2 unido a cada esfera.

Las muestras que producen valores de absorbancia inferiores al punto de corte se consideran como negativas para anticuerpos y no requieren análisis ulteriores. Las muestras que repetidamente son reactivas se considerarán como positivas según los criterios de éste ensayo y se procede a realizar un ensayo suplementario.

Conservación. Almacenar el kit a una temperatura de 2 a 8°C, utilizar hasta que alcancen la temperatura ambiente.

Limitaciones. No es conveniente utilizar éste método para identificar miembros de alto riesgo entre la población en general, el resultado reactivo no constituye el diagnóstico de SIDA, pueden esperarse resultados falsos positivos, la proporción dependerá de la prevalencia de la población sometida a estudio, un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección por el VIH. No utilizar mezcla de sueros, porque no se ha validado para éste caso.

Muestra. 150 µL de suero o plasma, se pueden refrigerar entre 2 y 8°C o bien congelar, evitar la hemólisis, muestras que tengan precipitados se debe centrifugar a 3000 rpm/10 min.

TECNICA

PRIMERA INCUBACIÓN.

1. Colocar 150 µL de cada control y muestra en el fondo de los pocillos correspondientes de la placa de reacción (tres controles negativos y dos controles positivos).
2. Agregar 50 µL de diluyente en cada pocillo que contenga una muestra o un control.



3. Añadir cuidadosamente una esfera a cada pocillo.
4. Cubrir con una hoja adhesiva e incubar a 40 ± 2 °C durante 30 min.
5. Retirar y desechar la hoja adhesiva. Aspirar el líquido y lavar cada esfera con agua destilada o desionizada completando un volumen total de lavado de 12 a 18 mL.

SEGUNDA INCUBACIÓN

6. Pipetear 200 μ L de conjugado diluido que contenga una esfera.
7. Nuevamente cubrir con una hoja adhesiva e incubar a 40 ± 2 °C durante 30 ± 2 min. en forma dinámica.
8. Repetir el paso número 5.

DESARROLLO DEL COLOR

9. Utilizar una placa pequeña y a los primeros cinco pocillos agregar una perla especial para blancos.
10. Pipetear 300 μ L de solución de sustrato OPD recién preparado a cada pocillo.
11. Cubrir las placas y mantenerlas en la obscuridad durante 30 ± 2 min.
12. Detener la reacción agregando 1 mL de ácido sulfúrico a cada pocillo.

LECTURA

13. Ajustar a cero el espectrofotómetro con un blanco de sustrato a 492 nm.
14. Determinar la absorbancia de los controles y muestras a 492 nm.
15. Utilizar el aparato "Comander de Abbott" que se ajusta con cinco blancos, tres controles negativos y tres controles positivos dando un valor de corte automáticamente.

INTERPRETACIÓN

Valor > valor de corte se considera positivo

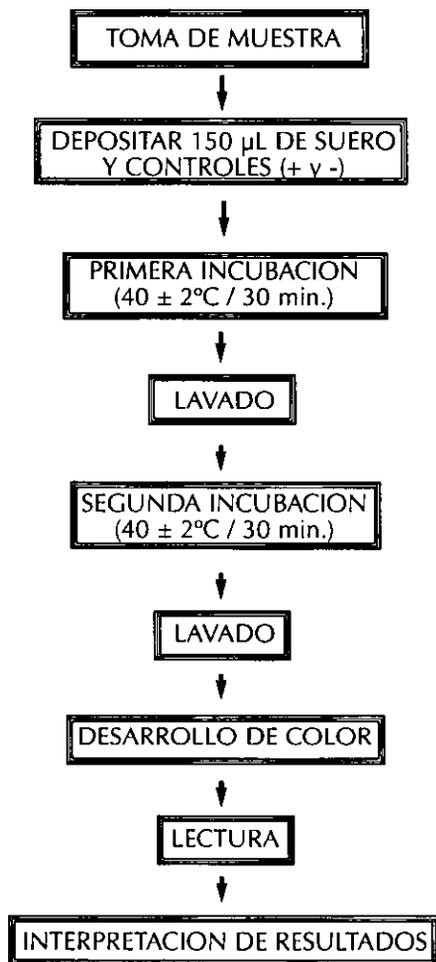
Valor < valor de corte se considera negativo.

NOTA: La presencia de anticuerpos o ausencia de anticuerpos anti-VIH1 y/o anti-VIH2 se determina comparando con el punto de corte. El punto de corte es igual a la absorbancia media de los controles negativos más 0,100. Para que sea válido es necesario que la diferencia de los valores medios de los controles positivos y negativos (P - N) sea igual o mayor a 0,400. Repetir en caso necesario. El cálculo es realizado automáticamente por el equipo de análisis.

$$\text{Punto de corte} = \text{NCx} + 0,100$$



DIAGRAMA DE FLUJO (ABBOTT VIH-1/VIH-2 EIA PLUS)





III. NOTA: Si se obtiene un resultado positivo en las pruebas anteriores se procede a realizar el WESTERN-BLOT(WB)

El método detecta anticuerpos anti-VIH-1 presentes en el suero para la confirmación de una respuesta anti-VIH positiva y precisar la especificidad antigénica en el cuadro diagnóstico del SIDA.

Principio. El ensayo se basa en la técnica ELISA indirecto sobre una membrana de nitrocelulosa que contiene todas las proteínas constitutivas del VIH-1.

Las proteínas del virus HIV-1 inactivado se separan en función de su masa molar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en medio disociante y reductor y posteriormente se transfieren electroforéticamente a la membrana de nitrocelulosa.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

A) Rehidratación de las tiras de nitrocelulosa.

B) Incubación de las muestras a confirmar y sueros de control. Si están presentes los anticuerpos anti-HIV- 1 se unirán a las proteínas virales presentes sobre la tira de la nitrocelulosa.

C) Después del lavado, se incuban las tiras con anticuerpos anti - IgG humanos marcados con fosfatasa alcalina. El conjugado se une a los anticuerpos anti-VIH-1 fijados al soporte sólido.

D) Después del lavado y eliminación del conjugado en exceso, la adición de solución de lavado permiten evidenciar la actividad enzimática de los complejos ligados a la nitrocelulosa

E) La aparición de bandas coloreadas específicas permite reconocer la presencia de anticuerpos anti VIH-1 en el suero.

Conservación. Mantener entre 2 y 8°C hasta la fecha de caducidad; la solución de lavado reconstituida permanece estable por un mes a la temperatura antes mencionada.

Muestra. 20 µL de suero no utilizar si hay hemólisis, ictericia y lipemia, no diluir, conservar entre 2 y 8°C o congelar a -20°C, evitar descongelaciones sucesivas, centrifugar a 3000 rpm/5 min. después de la descongelación en caso necesario.

TECNICA

1. Quitar la tapa transparente de la bandeja a utilizar. Asegurarse que el lado de las tiras que llevan la marca de inicio y la numeración, sea visible para que las proteínas virales presentes en este lado sean recubiertas por los diferentes reactivos a lo largo de la manipulación. Las tiras deben ser manipuladas con precaución con ayuda de las pinzas de plástico.

2. Añadir 2 mL de la solución de lavado/diluyente reconstituida a cada comportamiento. Incubar 5 minutos en agitación lenta.

3. Añadir 20 µL de cada muestra o suero de control en el pocillo del compartimento correspondiente. Incubar 2 horas a temperatura ambiente bajo agitación lenta.



4. Aspirar completamente el contenido de cada compartimento con la ayuda de una trampa de vacío provista de un frasco conteniendo un desinfectante (Hipoclorito de sodio al 10%). Cuidarse de no dañar la tira durante los lavados, aspirando desde los pocillos de los compartimentos provistos a este efecto.
Aclarar entre cada aspiración la punta de aspiración en contacto con las muestras para evitar contaminaciones entre las mismas.
Lavar cada tira con 2 mL de solución de lavado/diluyente reconstituida y eliminarla inmediatamente por aspiración respetando las precauciones anteriores.
Lavar cada tira 2 veces / 5 minutos, bajo agitación lenta, con 2 mL de solución de lavado/diluyente reconstituida (es decir, 3 lavados en total). Eliminar la solución del último lavado.
5. Distribuir 2 mL de conjugado por compartimento habiendo equilibrado previamente la solución a temperatura ambiente.
Incubar 1 hora a temperatura bajo agitación lenta.
6. Lavado. Proceder como en el punto 4.
7. Distribuir 2 mL de la solución de revelado por compartimento.
Si existiesen partículas en suspensión en la solución de revelado, dejar que se decanten en el fondo del frasco antes de pipetear.
(Estas partículas no interfieren con el ensayo).
Incubar en agitación lenta y vigilar la aparición de color. Se deben poder visualizar todas las bandas correspondientes a las proteínas virales en el suero de control positivo. (Tiempo de revelado: alrededor de 5 minutos).
8. Parar la reacción eliminando la solución de revelado y aclarando las tiras 3 veces con agua destilada.
9. Secar las tiras entre dos hojas de papel de filtro a temperatura ambiente.
Montar las tiras alineándolas respecto a la marca de inicio.

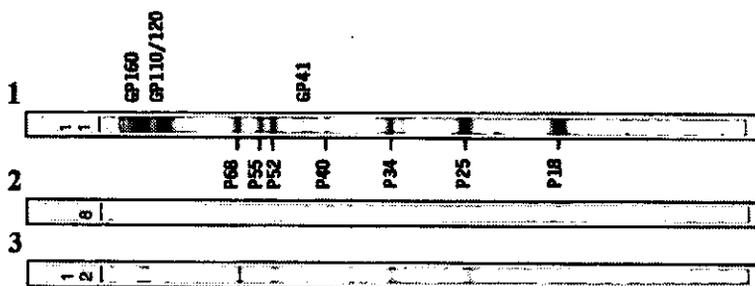
ATENCIÓN: No pegar el plástico adhesivo sobre la parte de las tiras correspondiente a las proteínas virales.

INTERPRETACION

La presencia de anticuerpos del virus VIH-1 en la muestra, se traduce por la aparición de bandas específicas coloreadas (azul-violeta). Su posición corresponde a los pesos moleculares de las proteínas virales representadas en la tabla 2 y el perfil de bandas en la fig. 8.

Tabla 2. Proteínas constitutivas del VIH-1 de acuerdo al inserto.

DENOMINACION	GEN	NATURALEZA	ASPECTO EN WB
gp160	env	Precursor de gp110/120 y gp41	Banda nítida
gp 110/120	env	Glicoproteína de envoltura	Banda de bordes difusos
p68	pol	Transcriptasa reversa	Banda nítida
p55	gag	Precursor de proteínas internas	Banda doble
p52	pol	Transcriptasa reversa	Banda nítida
gp41	env	Glicoproteína transmembranal	Banda difusa
p40	gag	Precursor de proteínas internas	Banda nítida
p34	pol	Endonucleasa	Banda nítida
p24/p25	gag	Proteína interna	Banda nítida
p18	gag	Proteína interna	A veces banda doble



1. Control Positivo
2. Control Negativo
3. Suero Positivo diluido

Fig. 8 Identificación de las Bandas en las tiras de nitrocelulosa

Ayudarse con el control positivo para identificar a los anticuerpos revelados, y a continuación referirse a la tabla 3 de acuerdo al criterio establecido por el grupo de Estudio del SIDA del consejo de Europa, OMS (18).

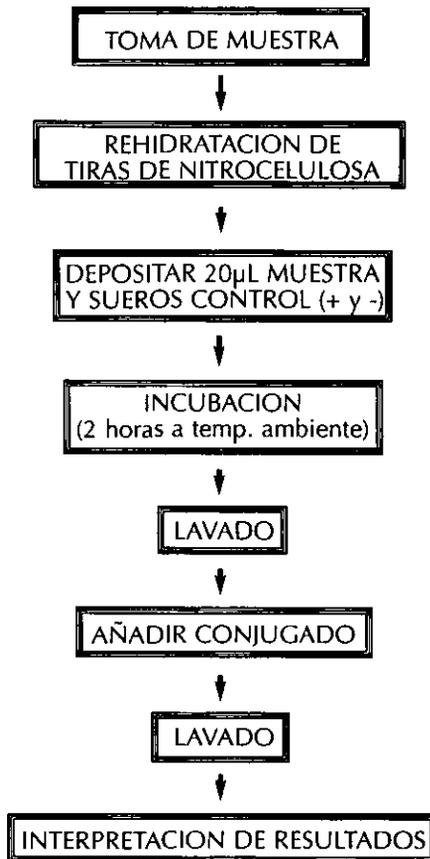
Tabla 3. Criterios de interpretación de acuerdo a la OMS.

INTERPRETACION	PERFIL
Positivo	2 env + gag(1 ó más); 2 env + pol(1 ó más); 2 env + gag + pol
Indeterminado *	1 env ± gag ± pol; gag + pol; gag; pol
Negativo	Ninguna banda.

* Indeterminado: Debido a seroconversión, VIH-2 o reacción cruzada con otros retrovirus.



DIAGRAMA DE FLUJO (WESTERN-BLOT)





IV. VIDAS HIV P24 II Confirmación

Principio. La determinación se realiza mediante un inmunoensayo ligado a una enzima por Fluorescencia(ELFA), realizado automáticamente. El cono funciona como fase sólida y como sistema de pipeteo. Los demás reactivos están preredistribuidos en el cartucho. Todos los pasos del ensayo los realiza de forma automática el instrumento.

El antígeno p24 presente en la muestra se une a los anticuerpos que están en la fase inferior del cono y son reconocidos por anticuerpos anti-p24 biotinilados. Los componentes no unidos son eliminados durante las siguientes fases de lavado. El complejo formado es marcado con un conjugado de Estreptavidina y fosfatasa alcalina. Un lavado final elimina y remueve los componentes no unidos. Durante el paso final de detección, el sustrato (4-metil umbeliferil fosfato) se aspira y expone en el cono. La enzima presente en el conjugado cataliza la reacción del sustrato dando un producto (4-metil umbeliferona), la fluorescencia se mide a 450 nm. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de antígeno p24 presente en la muestra.

Al final del ensayo, los resultados son calculados automáticamente por el VIDAS en relación a una curva de calibración instalada en la memoria, posteriormente se imprime.

Conservación. Mantener los reactivos entre 2-8°C, no congelar.

Limitaciones. La presencia de complejos antígeno p24 con anti-p24 pueden enmascarar el resultado. Los niveles de antígeno disminuyen por la autodegradación o por la conservación de la muestra. Existe notable variación de la estabilidad del antígeno, especialmente en muestras que contienen bajos títulos de antígeno p24.

Muestra. 200µL de suero o plasma (EDTA, heparina, oxalato). El citrato de sodio puede causar falsos positivos. Si tiene impurezas la muestra se debe centrifugar, se puede conservar entre 2-8°C como máximo 2 días, o bien congelar a $-25 \pm 6^\circ\text{C}$, no utilizar si hay hemólisis, ictericia o lipemia.

Calibración. Se realiza con cada nuevo lote y después cada 15 días, permite ajustar la calibración de cada sistema y la evolución de los reactivos. El estándar S1 es ensayado por duplicado. El valor del estándar debe estar dentro del Valor de Fluorescencia Relativa , de lo contrario se debe repetir, si no la media no será memorizada.



PROCEDIMIENTO.

1. Sacar los reactivos a temperatura ambiente 30 min. antes.
2. Sacar y rotular los cartuchos necesarios, considerar los controles (C1 positivo y C2 negativo) y estándar S1 por duplicado.
3. Colocar el cartucho sobre la bandeja de preparación.
4. Crear la lista de trabajo (iniciando con el código p24), introducir el número de ensayos, así como la identificación de las muestras.
5. Si es necesario centrifugar las muestras para eliminar restos de fibrina, homogenizar en el vortéx las muestras, estándar y controles.
6. Pipetear 200 μ L de muestra, estándar y controles en los pocillos de muestra de los cartuchos.
7. Colocar en las posiciones indicadas en pantalla.
8. Iniciar el análisis, todas las etapas se realizan automáticamente. Los resultados se obtienen en 1 hora y 30 minutos aproximadamente.
9. Eliminar los cartuchos utilizados en un contenedor rojo de residuos biológico-infecciosos.

INTERPRETACION

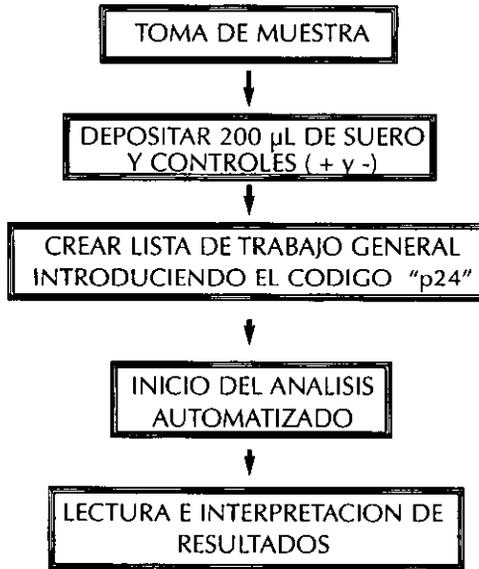
Los resultados se expresan en pg/ml de antígeno p24 o en pg/ml de antígeno del VIH (1 pg/ml de antígeno p24 = 3.65 pg/ml de antígeno VIH). Las unidades que se requieren se seleccionan en el menú y se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Interpretación de la prueba confirmatoria para antígeno p24.

TITULO	INTERPRETACION
<3 pg/ mL Ag p24; <10.95 pg/mL Ag VIH	Negativo
≥ 3 y <5 pg/mL Ag p24; ≥ 10.95 y <18.25 pg/mL Ag VIH	Indeterminado
≥ 5 de Ag p24; ≥ 18.25 pg/mL Ag VIH	Positivo

Un resultado positivo es confirmado por Neutralización, al igual que un resultado indeterminado. Las muestras con título superior a 400 pg/mL de Ag p24, puede diluirse 1:10.

**DIAGRAMA DE FLUJO
(VIDAS HIV P24 II CONFIRMACIÓN)**





VII. RESULTADOS

Se estudió una población de 350 muestras, cada muestra se analizó por ambos métodos de tamizaje (VIDAS HIV DUO y ABBOTT HIV-1/HIV-2 EIA Plus) y como método confirmatorio el Western-Blot y detección de antígeno p24 por neutralización. El resultado de acuerdo a cada método están representados en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de ambos métodos.

ABBOTT		VIDAS HIV DUO	
POSITIVO	1	POSITIVO	1
FALSO POSITIVO	1	FALSO POSITIVO	2
NEGATIVO	348	NEGATIVO	347

Al realizar el análisis estadístico con X^2 utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows 3.1, los resultados son:

Tabla 6. Resultados de acuerdo a X^2 .

		ABBOTT		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
HIV DUO	POSITIVO	1	1	2
	NEGATIVO	2	346	348
	TOTAL	3	347	350

<u>X²</u>	<u>Valor</u>	<u>Significancia</u>
Pearson	57.1643	0.00000
Corrección Yates	13.79690	0.000020

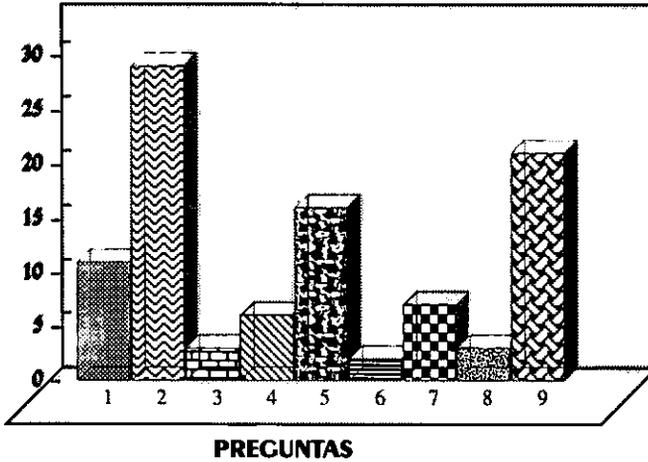
De las 350 muestras analizadas, 87 son consideradas de alto riesgo con base al cuestionario de Autoexclusión proporcionado a cada donador. De acuerdo a la respuesta afirmativa a cada cuestionamiento, excepto para la pregunta 9 que corresponde a una respuesta negativa, se obtienen los siguientes datos:

Tabla 7. Datos según la respuesta obtenida en los 87 cuestionarios de Autoexclusión.

PREGUNTA	Respuesta Afirmativa
1	11
2	29
3	3
4	6
5	16
6	2
7	7
8	3
9	21 (Respuesta Negativa)



Factores de Riesgo (Cuestionario de autoexclusión)



Gráfica 1. Cuestionario de autoexclusión.

CUESTIONARIO DE AUTOEXCLUSION

-  1. ¿TE HAS INYECTADO POR LAS VENAS?
-  2. ¿ADEMÁS DE LA PAREJA SEXUAL FIJA, HAS TENIDO RELACIONES SEXUALES O HAS HECHO EL AMOR CON OTRAS PERSONAS EN LOS ÚLTIMOS DOCE MESES?
-  3. ¿HAS HECHO EL AMOR CON PERSONAS QUE EJERZAN LA PROSTITUCIÓN, EN LOS ÚLTIMOS DOCE MESES?
-  4. ¿TIENES O HAS TENIDO RELACIONES HOMOSEXUALES?
-  5. ¿TU PAREJA HA TENIDO O MANTIENE RELACIONES SEXUALES CON OTRA (S) PERSONA (S), EN LOS ÚLTIMOS DOCE MESES?
-  6. ¿ALGUNA VEZ TE HAS DEDICADO A LA PROSTITUCIÓN?
-  7. ¿HAS HECHO EL AMOR CON PERSONAS QUE SON BISEXUALES?
-  8. ¿HAS HECHO EL AMOR EN LOS ÚLTIMOS DOCE MESES CON PERSONAS QUE PADEZCAN HEPATITIS, SÍFILIS, SIDA?
-  9. ¿CONSIDERAS QUE TU SANGRE ES SEGURA Y PUEDE SER TRANSFUNDIDA A UN ENFERMO?

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

Al término del estudio, con el método VIDAS HIV DUO, se obtiene un resultado falso positivo, se considera como tal, porque al realizar la prueba confirmatoria (Western- Blot) no se aprecia ninguna banda en la tira de nitrocelulosa, por lo tanto es negativa para la presencia de anticuerpos específicos contra el VIH-1, así mismo es negativo con el método de confirmación de antígeno p24 por neutralización.

La muestra que resultó positiva por ambos métodos (VIDAS HIV DUO y ABBOTT VIH-1/VIH-2 EIA Plus), catalogada así, porque se aprecia la formación de bandas en la tira de nitrocelulosa, indicativo de que existen anticuerpos específicos contra el VIH-1.

A su vez, con el método de ABBOTT VIH-1/VIH-2 EIA Plus, se obtienen dos resultados falsos positivos, considerados así, porque es negativo el Western-Blot que identifica anticuerpos contra proteínas específicas del VIH-1. Una de las causas posibles de éste resultado es que exista otro proceso inmune, o bien que el donante se encuentre en el periodo de ventana.

Respecto a la fase analítica del estudio: VIDAS HIV DUO, requiere de aproximadamente 90 min. para su realización, requiere poco trabajo manual, todas las reacciones se llevan a cabo de forma automatizada. Esto permite obtener un resultado oportuno, además de eliminar la posibilidad de error inherente a un proceso manual, de parte del operador. En tanto que Abbott VIH-1/VIH-2 EIA Plus, se realiza en aproximadamente 120 min. y mucho de los pasos son manuales, lo que puede considerarse como diferencia importante.

Si bien es cierto que VIDAS HIV DUO requiere una mayor cantidad de suero, esto sería justificable, si se lograra identificar una prueba positiva que no sea detectada por el método que solo detecta anticuerpos contra el VIH-1. Representando así un acortamiento en el período de ventana, en el que únicamente está presente el antígeno p24, en ausencia de la producción de anticuerpos. Desafortunadamente en la población estudiada no se detecta ningún caso positivo con el método VIDAS HIV DUO, principalmente que se deba a la presencia de antígeno p24, que sería muy significativo para elegir entre ambos métodos. Lo anterior con la reserva de que éste método no puede considerarse como una prueba aislada de identificación del antígeno.

Se ha discutido mucho sobre la evaluación de los métodos inmunoenzimáticos, que según algunos autores opinan se ve influenciada por la población estudiada y cuando se evalúa sensibilidad y especificidad, pareciera que se evalúa a la casa comercial productoras del panel de suero estándar de oro y no al método (5).

En el caso de la población estudiada (donadores), de acuerdo a la NOM-SSA3-93. Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos, desde que se inicia el proceso de donación se va dando una selección encaminada a garantizar que el producto a transfundir cumple con todos los requisitos, al final en la sala de donación se les otorga el cuestionario de autoexclusión como último intento para concientizar al donante y eliminar una posible fuente infectante. Este cuestionario tiene 8 preguntas, que constituyen factores de riesgo, de ser afirmativa la respuesta en al menos un cuestionamiento, es considerado como de alto riesgo y se da de baja el producto, se realiza la serología obligatoria entre ellos la detección del VIH-1. Como reflejo de la falta de educación y tal vez concientización, es que sí se dan casos de autoexclusión, aún después casi todo el proceso de donación.



En la población de estudio 87 muestras son consideradas como de alto riesgo con base al cuestionario de autoexclusión. El factor predominante de riesgo para adquirir la infección por el VIH-1, objeto de estudio, no el único, es que además de la pareja fija se tiene relaciones sexuales sin protección con otras personas en los últimos doce meses. Tiene estrecha relación en el caso de las parejas heterosexuales, en el que se ha observado un incremento en casos de infección con el VIH-1 o SIDA en mujeres, que sólo tienen relaciones sexuales con su pareja. Otra característica importante de destacar en éstos cuestionarios es que algunos donantes sólo responden que consideran su sangre como no segura para ser transfundida, también se consideran de alto riesgo. Se cree que aún acuden personas como posibles donantes para saber si están o no infectadas y evitan el costo que tienen los métodos de diagnóstico. Finalmente ninguna de las 87 muestras de alto riesgo, analizadas por ambos métodos resulta positiva.



IX. CONCLUSIONES

1) De acuerdo al análisis estadístico con X^2 sí existe diferencia significativa entre ambos métodos (VIDAS HIV DUO y ABBOTT VIH-1/VIH-2 EIA Plus) en una población de 350 muestras. Esto es, el resultado es dependiente del método de diagnóstico utilizado.

2) Con la población estudiada, no se observa una mayor frecuencia de casos positivos con el método VIDAS HIV DUO, respecto al método ABBOTT VIH-1/VIH-2 EIA Plus. Por lo tanto, los datos no son suficientes para sustentar que el método VIDAS HIV DUO represente una nueva alternativa, en cuanto a métodos de diagnóstico de tamizaje se refiere.

Se sugiere realizar el estudio en una población mayor, para observar si el método VIDAS HIV DUO detecta a individuos a los pocos días de ocurrida la infección con el VIH-1, importante en un Banco de sangre donde el riesgo de transmisión por transfusión existe aún cuando es muy pequeño. También evaluar su aplicación en otro tipo de población.



X. GLOSARIO

Anorexia. Pérdida del apetito a los alimentos.

Anticuerpo. Moléculas secretadas por células plasmáticas y precursores de linfocitos B, de reconocimiento específico y eliminación de los antígenos.

Antígeno. Sustancia extraña que induce una respuesta inmune específica.

Anticuerpos monoclonales. Copias idénticas de un anticuerpo que consisten en una clase de cadena H y cadena L.

Artralgia. Presencia de dolor en articulaciones, se utiliza cuando no hay inflamación.

Caquexia. Término que denota una alteración constitucional, desnutrición y mala salud en general. Sus signos principales son el desgaste muscular, piel brillante y enferma y ojos intensamente opacos.

Citocinas. Proteínas que median la fase efectora de la respuesta inflamatoria e inmunitaria.

Epítopo. Porción del antígeno reconocidos de forma específica por linfocitos individuales, que interacciona con una porción del anticuerpo, denominada paratope.

Especificidad. Se refiere a la habilidad de una prueba para identificar correctamente a todos los negativos.

Linfadenopatía. Se refiere a cualquier enfermedad de ganglios linfáticos.

Maculopapular. Presencia de manchas palpables sobre la piel.

MHC. Complejo mayor de histocompatibilidad, región de genes muy polimórficos, cuyos productos se expresan en la superficie de diversas células. HLA para los linfocitos humanos, identifican la presencia de péptidos de proteínas extrañas.

Mialgia. Dolor en los músculos.

Neuritis. Inflamación de un nervio.

Sensibilidad. Habilidad de una prueba para detectar casos positivos.

Superantígeno. Grupo de proteínas, muchas de las cuales son toxinas bacterianas capaces de unirse al MHC clase II, reconocidos por un gran número de linfocitos CD4.

Urticaria. Erupción cutánea alérgica que se caracteriza por múltiples ronchas pruriginosas, lisas, elevadas, de color rosa, dura algunos días sin dejar huella visible.



XI. REFERENCIAS

1. Arredondo J. L. Calderón J. E. Conceptos Clínicos de Infectología; 10a ed. México 1993; Méndez Editores: 488-509.
2. Josep M. Gallet Artigas. Guía práctica del SIDA. 2a ed. Barcelona. Salvat Editores, 1990:1- 9.
3. Alvarado F. L.. Algunos datos Históricos del SIDA y conocimientos del VIH y sus consecuencias; Acta Médica: Enero-Junio, 1994: 30(117-18): 61-77.
4. Sidney P. Arnold B.R. HIV gene expression- A Target for antiviral Therapy Pharmaceutical Technology; April 1992:28 -36.
5. John M. Coffin. AIDS and Other Manifestations of HIV; Third edition. Philadelphia 1998: Lippincott-Raven Publishers: 41-3, 123-41,161-88.
6. Merle A. S. Paul A. V. The Medical Management of AIDS; Fifth Edition, Philadelphia 1997: W. B. Saunders Company: 17-106.
7. Knipe M. D. Fields N. B. Virology: New York, 1990:Raven Press: 1529-70.
8. M. C. Lipman, T. A. Glock and M. A. Johnson. An Atlas of Diferential Diagnosis in HIV Disease; New York 1999: The Parthenon Publishing Group: 9-19.
9. Soler C. C. Gudiño R. J. C. A 11 años del descubrimiento del virus de Inmunodeficiencia Humana; Salud Pública; Nov-Dic.1995; 37(6): 499-509.
10. Sepúlveda A. J. Del Río Z. A. Valdespino G. J. L. García G. L. Velázquez V. L. Volkow P. La estrategia de Prevención de la Transmisión del VIH/SIDA a través de la sangre y sus derivados en México; Salud Pública 1995;37(6): 624-35.
11. Olivares L. F. SIDA asociado con transfusión de sangre; Salud Pública: Julio-Agosto, 1993;35(4):351-6.
12. Dolin R. Masur H. Saag S. M. AIDS Therapy; Churchill Livingstone ; USA 1999:3-14.
13. SIDA, La epidemia de los tiempos modernos; Organización Panamericana de la Salud: 1993 Washinton D. C.20037 EUA.
14. T. D. Ly. M. Lapeyre and E. Brignoli. Evaluation of vidasVIDAS HIV DUO foro he simultáneos detección of p24 Ag HIV1 and HIV2 antibodies; AIDS: Junio-Julio 3 1998.
15. Bernard Weber. EL Hadji Mbargane fall. Annemarie berger and Hans Wilhelm doerr. Reduction of Diagnostic window by New fourth Generation Human Inmunodeficiency Virus



Screening Assays; *Journal of Clinical Microbiology*: Aug 1998: 36(8): 2235-39.

16. A. M. Couroucé. Combined screening tests for anti-VIH antibodies and p24 antigen; *La Gazette de la transfusion*; Mars-Avril 1999:155: 1-15.
17. Moreno R. J. Respuesta Inmune y Mecanismo de Autoinmunidad. México D. F. 1996. Edit. Limusa: 825-35.
18. NOM-010-SSA2-1993. Norma Oficial para la Prevención y Control de la Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana: Secretaría de Salud, CONASIDA: 1995.
19. NOM-SSA3-93 Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
20. Saule M. Volbérding P. *The Medical Management of AIDS*; fifth edition. USA 1997; W.B. Saunders Company; 17-28.
21. Dolin R. Masur H. Saag M. *AIDS Therapy*; Churchill Livingstone, USA 1999; 3-14.
22. Anderson & Ness. *Scientific Basis of Transfusion Medicine, Implications for Clinical Practice*; W. B. Saunders Company, USA 1994; 669-93.
23. Magis R. C. Bravo G. E. Anaya L. L. Uribe Z. P. La situación del SIDA en México a finales de 1998; *SIDA, ETS, Enfermedades de Transmisión Sexual*: Oct-Diciembre 1998: 4(4):143-55.
24. Adrian M. R. Luke W. Using STD Occurrence to monitor AIDS Prevention; *Soc. Set. Med.*; 1994; 38(8):1153-65.
25. Casanova G.R. Ortiz I. J. *Las Enfermedades de Transmisión Sexual: Causa de complicaciones perinatales*; *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*: 1994;14(1):25-28.
26. Vandale S.T. Uribe F. Cruz A. Uribe P. Hernández M. Factores de riesgo asociados con el sexo desprotegido en trabajadoras del sexo de la ciudad de México; *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*: 1995;15(4):178-83.
27. Donald. P.F. James C.. *The Prevention of Acquired Immunodeficiency Syndrome in the United States*; *JAMA*: March, 1987: 257(10):1357-66.
28. Warner C. Greene. *SIDA y Sistema Inmunitario*; *Investigación y Ciencia*: Noviembre 1993: 59-66.
29. Vincent T. Devita. *SIDA*. 2a ed. Barcelona; Salvat Editores. 1990:61-77.
30. T. Cabezas. E. Quirós. F. García. J. Hernández Quero. M.C. Bernal, M. A. Martínez . J. de la Higuera. G. Piedrola, M.C. Maroto. Inmune Complex p24 Antigen: A New Prognostic Marker in Human Immunodeficiency Virus Infection; *Infection*. 1994: (22)1:8-11.



31. Seiichi Hashida, Kasuya Hashinaka, Ichiro Nishikata, Shinichi Oka, Kaoru Shimada, Atsushi Saito, et al. Shortening of the window period in diagnosis of HIV-1 infection by simultaneous detection of p24 Antigen and antibody IgG to p17 and reverse transcriptase in serum with ultrasensitive enzyme immunoassay; *Journal of Virological Methods*, 1996: 62: 43-55.
32. Denis R. Henrard, Sam Wu, Jack Phillips, Dallas Wetsner and John Phair. Detection of p24 Antigen with and without Immune Complex. Dissociation for Longitudinal Monitoring of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection; *Journal of Clinical Microbiology*; Jan 1995: 33(1):72-5.
33. Juzo Matsuda. Comparative Study of Capture Assays for Detection of p24 Antigen in Patients Infected with the Human Immunodeficiency Virus; *Clinical Infectious Diseases* 1994: 18: 1021-2.
34. F. Lepont, D. Costagliola, C. Rouzioux and A. J. Valleron. How much would the safety of blood transfusion be improved by including p24 antigen in the battery of tests?; *Transfusion* 1995: 35: 542-7.
35. Lathey L. J., Marschner C. I., Kabat B. and Spector A. S. Deterioration of Detectable Human Immunodeficiency Virus Serum p24 Antigen in Samples Stored for Batch Testing; *Journal of Clinical Microbiology*; Mar 1997: 35(3): 631-35.
36. Korelitz J.J., Busch M. P., Williams A. E. Antigen testing for human immunodeficiency virus (HIV) and the magnet effect: will the benefit of a new HIV test be offset by the numbers of higher-risk, test-seeking donors attracted to blood centers?. *TRANSFUSION* 1996;36: 203-208.
37. Burin R. N. Detection of HIV-1 RNA in Two Consecutive Blood Donations Screened Negative for HIV Antibodies; *Vox Sang* 1998;75: 298-302.
38. *Epidemiología*: 17(1): 7- 20.
39. Trabajos no publicados:

T.D. LY, M. LAPEYRE and E. BRIGNOLI. Evaluation of VIDAS HIV DUO for the simultaneous detection of p24 Ag HIV-1 and HIV-2 antibodies. Presentado en: 12 th world AIDS Conference, June 28-July 3, 1998, Genova, Switzerland.

Etablissement de Transfusion Sanguine de Strasbourg, France, 22nd October 1997, Head of Department.

T. D. Ly. Evaluation report on the VIDAS HIV 4 DUO reagent at the Institut Alfred Fournier, August-October 1997.

Dr. F. Simon. Evaluation of the VIDAS HIV DUO Reagent University Hospital Bichat-Claude Bernard Virology Laboratory, Hopital BICHAT-CLAUDE BERNARD. 08-09/97.