



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Sensibilidad de la prueba de escrutinio (Architec) a  
través del antígeno p24 por el método de ELISA para el  
diagnóstico de infección por VIH**

**T E S I S**

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

**P R E S E N T A :**

**ANEL GARCÍA CERVANTES**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Q.F.B. BRENDA MARISOL RODRÍGUEZ  
ALVARADO**

**ASESOR DE TESIS :**

**DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**

**2 DE DICIEMBRE DEL 2013**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS:**

*Por darme salud, fortaleza, sabiduría y haberme permitido culminar mi carrera con éxito.*

### **A CARPERMOR:**

*Agradezco mucho a la Q.F.B. Luz Elena Alcántara Gómez y al Q.F.B. Mario García Sánchez, por haberme permitido entrar a la empresa e iniciar un proyecto, porque gracias a su aportación pude cumplir la meta más importante de mi vida.*

### **A MI DIRECTORA, ASESORA Y SINODALES:**

*Un especial agradecimiento a la Q.F.B. Brenda Marisol Rodríguez Alvarado por brindarme este proyecto, por su apoyo, esfuerzo, dedicación, tiempo, paciencia, conocimiento, su confianza y sobre todo por una bonita amistad que me ha brindado.*

*A la Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez por su apoyo, su tiempo, su visión crítica, gracias a su experiencia y a sus consejos que me ayudaron a la elaboración de la tesis.*

*Agradezco a mis sinodales a la Dra. Juana Rosado Pérez, M. en C. Araceli García Del Valle y a la Q.F.B. Carina Gutiérrez Iglesias por su tiempo dedicado y sus valiosas aportaciones para mejorar mi trabajo.*

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS**

### **A MI MADRE:**

*Con todo mi amor mamá te dedico está meta más de mi vida, te agradezco profundamente por todo tu amor, tu apoyo incondicional, comprensión, tu esfuerzo para que terminara mi carrera, por darme todo sin pedir nada a cambio, por tu dedicación, por tu paciencia, por estar conmigo en todo momento, por ser mi mejor amiga, por tu confianza, por tus noches de desvelo en toda mi carrera, por tus palabras certeras que me daban la fuerza necesaria para seguir adelante, por acompañarme en toda esta aventura y sobre todo por haber fomentado en mi el deseo de superación; por lo que concluyo que el triunfo es tuyo pues eres la luz que ilumina mi camino y gracias a ti todo esto fue posible. TE AMO*

### **A MIS HERMANOS:**

*Con todo mi amor para Tatos y Coco que me brindaros su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento, por sus consejos, sus regaños, por darme todo sin pedir nada a cambio, por ser mis cómplices y mis mejores amigos.*

### **A MIS SOBRINAS:**

*Con todo mi amor para mis princesas Azul y Andy que son como mis hijas, que estuvieron en mis noches de desvelo siendo mis angelitos de la guarda y que están siempre conmigo haciendo mi vida cada día que crecen más feliz.*

### **A MI NOVIO:**

*Abel Alejandro Urbano Palafox porque entraste a mi vida brindándome tu amistad incondicional, gracias por tu apoyo, por tu ayuda en todo, por cuidarme, por escucharme, por tus consejos, por estar en los momentos más difíciles y levantarme, por enseñarme a luchar por lo que quiero, por tu comprensión y paciencia sobre todo por hacerme reír y enojar todos los días de la carrera. A ti que entraste a mi vida y sin buscarlo el destino nos unió, lo que empezó con una bonita y sincera amistad nos convirtió en uno, sabes que me llevaría varias hojas describiendo lo que significas para mí y el enorme agradecimiento por todo lo que has hecho por mí.. Te agradezco porque para terminar este proyecto lo hice junto a ti, gracias por esperarme y caminar siempre juntos.*

*Te amo Abel*

### **A MIS AMIGOS:**

*A Kary y Yaz, porque compartieron conmigo buenos y malos momentos dentro y fuera de la universidad, por su apoyo, por sus enseñanzas de vida, por su bonita amistad y formar parte de mi vida.*

## **INDICE**

<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>III. MARCO TEÓRICO</b>	3
3.1 Antecedentes	3
3.2 Descripción del virus	4
3.3 Estructura del VIH-1	5
3.4 Ciclo replicativo del VIH-1	8
3.5 Entrada del VIH-1 en la célula	9
3.6 Primoinfección VIH	11
3.7 Pruebas diagnósticas para el VIH	12
3.8 Métodos directos	13
3.9 Métodos indirectos	16
3.10 Otras pruebas indirectas utilizadas para el diagnóstico del VIH	20
3.11 Confiabilidad de las pruebas diagnósticas	22
3.12 Causas de resultados indeterminados, falsos positivos y negativos	25
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	28
<b>V. OBJETIVO</b>	29
<b>VI. HIPÓTESIS</b>	29
<b>VII. METODOLOGÍA</b>	30
7.1 Diseño de investigación	30
7.2 Población	30
7.3 Criterios	30

7.4 Variables	30
7.5 Método	31
7.6 Procedimiento de la prueba de Western blot	31
7.7 Determinación del antígeno p 24 por ELISA	33
7.8 Aspectos de control de calidad	36
7.9 Análisis estadístico	36
<b>VIII. RESULTADOS</b>	37
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	40
<b>X. CONCLUSIÓN</b>	45
<b>XI. PROPUESTAS</b>	46
<b>XII. ANEXOS</b>	47
<b>XIII. REFERENCIAS</b>	50

## I. RESUMEN

**Antecedentes:** La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ha sido considerada una pandemia, por lo que es importante diagnosticarla oportunamente. En la actualidad existen marcadores séricos que permiten una mejor caracterización de la infección por VIH, uno de ellos constituye una de las proteínas estructurales del *core* de VIH-1, denominada proteína p24 o antígeno p24. En muchas ocasiones existe la posibilidad de obtener tanto falsos positivos como negativos en las pruebas de escrutinio, y aún en la confirmatoria (Western blot), por lo que es necesario probar la eficacia de nuevos marcadores como el antígeno p24, el cual nos muestra la presencia del virus en el organismo a diferencia de las pruebas de detección de anticuerpos, con muestras clínicas limítrofes.

**Objetivo:** El propósito del estudio fue determinar la confiabilidad diagnóstica de la prueba de escrutinio (Architec) a través del antígeno p24 por el método de ELISA para el diagnóstico del VIH.

**Métodos:** Se llevó a cabo un estudio de tipo observacional, transversal, prolectivo y comparativo, en el que se estudiaron muestras de pacientes referidas del laboratorio Carpermor del mes de agosto del 2012 a febrero del 2013, con resultados discordantes entre la prueba de escrutinio (Architec) y la prueba confirmatoria (Western blot). Todas las muestras se analizaron por los métodos: quimioluminiscencia, Western blot y determinación del antígeno p24 por el método de ELISA. Los datos obtenidos se analizaron con mediante un programa estadístico SPSS V.20.

**Resultados:** Se analizaron 141 muestras, de las cuales 136 tuvieron resultados discordantes. De éstas, 11 (8%) fueron positivas 125 (92%) fueron negativas al antígeno p24. Hay una coincidencia de resultados negativos del 97% y de positivos del 24%, con un 76% de falsos positivos y 3% de falsos negativos. La confiabilidad diagnóstica de la prueba de escrutinio (Architec) fue: sensibilidad de 72% y especificidad del 79%.

**Conclusiones:** Se encontró 11 (8%) de muestras positivas y 125 (92%) de muestras negativas al antígeno p24 en muestras discordantes y una coincidencia de resultados negativos del 97% y positivos del 24% entre el método de quimioluminiscencia (Architec) y el ELISA para antígeno p24. El método que utiliza el equipo Architec tiene una sensibilidad del 72% y una especificidad del 79%.

## II. INTRODUCCIÓN

En 1981 el descubrimiento del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y lo que posteriormente constituiría el llamado Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), abre las puertas para su diagnóstico a través de diversas pruebas. Durante este tiempo, los laboratorios han tenido que hacer una gran labor y esfuerzo para adaptarse a las demandas clínicas requeridas por los pacientes.

La infección por VIH y su consecuencia el SIDA se han podido conocer, seguir, y, en algunos casos, controlar, gracias a la disponibilidad de pruebas diagnósticas. Una prueba diagnóstica en un individuo infectado asintomático puede significar muchos años de vida ganados y con buena calidad de vida, al mismo tiempo que permite evitar nuevas infecciones. El diagnóstico de la infección por el VIH se establece por medio de pruebas, como por ejemplo el aislamiento del virus en cultivo, mediante la detección del antígeno p24, medir la respuesta de anticuerpos por métodos como quimioluminiscencia o western blot, detectar el ácido nucleico del virus, entre otros. La titulación de los niveles de anticuerpos anti p24 y del antígeno p24 se ha usado como marcador de la progresión de la infección por VIH, como se ha reportado en la literatura.

Las pruebas habituales para la detección del VIH han experimentado un considerable desarrollo y mejoras desde la aparición del VIH tipo 1 (VIH-1) y VIH tipo 2 (VIH-2). Básicamente, las mejoras han sido dirigidas a los antígenos utilizados en los ensayos y al principio técnico en las que se fundamentan dichas reacciones. En los enzimoimmunoanálisis (EIA) de primera generación se utilizaban lisados virales para el VIH-1, en la actualidad los EIA de cuarta generación utilizan péptidos recombinantes-sintéticos de VIH-1 y VIH-2 y anticuerpos para detectar el antígeno p24. La evolución de estos antígenos ha permitido, por una parte, incrementar la sensibilidad y la especificidad, y por otra, ha hecho posible la detección de anticuerpos frente a tipos y subtipos del VIH, los cuales no era posible detectar con las técnicas de diagnóstico habituales. A pesar de las mejoras introducidas en los equipos actuales, debe tenerse en cuenta la posibilidad de encontrar sueros de pacientes infectados por subtipos inusuales, sobre todo en pacientes de África o en personas con estancias prolongadas en este continente.

Por ello la importancia de evaluar la sensibilidad de la prueba de escrutinio (Architec) ya que es muy importante que los reactivos empleados en el laboratorio sean evaluados para garantizar que los resultados de los pacientes son confiables. Respecto a la prueba de confirmación actualmente se sigue usando el Western blot que es considerada la prueba de oro para la confirmación de anticuerpos frente al VIH, existen distintos criterios de positividad emitidos o recomendados por organismos o sociedades involucrados en el diagnóstico del VIH, entre ellos, la Organización Mundial de la Salud (OMS).



### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Antecedentes

En 1981 los Centros para el Control de Enfermedades (CCE) y el Center For Disease Control (CDC) publicaron los casos de cinco varones homosexuales en California que habían adquirido neumonía por *Pneumocystis carinii* (NPC). En Nueva York se publicó un informe adicional de 26 casos de NPC y sarcoma de Kaposi en varones homosexuales; todos estos enfermos tenían un deterioro notable de la respuesta inmunológica celular.<sup>1</sup>Fueron estas publicaciones las primeras descripciones de una pandemia que ha ganado importancia nivel mundial y de la que lamentablemente aún no se ha podido encontrar la cura.

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), es la consecuencia de la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) que se origina con el paso del tiempo. Este virus fue aislado por primera vez en 1983 en el Instituto Pasteur de París. Al inicio de su descubrimiento recibió diferentes designaciones como Virus asociado a linfadenopatías (LAV), Virus linfotrópico T Humano III (HTLV-III) y Virus asociado al SIDA (ARV).

Durante los primeros años de su aparición, el SIDA era considerado como una enfermedad que arrasaba fundamentalmente con homosexuales y drogadictos, pero su velocidad de extensión era muy rápida alcanzando incluso una tasa de duplicación cada 10 meses, desatándose una angustia y calificando a esta enfermedad como la “peste del Siglo XX”. Se sabe que el SIDA afecta sin distinción a todo tipo de personas sin discriminación de raza, país o condición social, por lo tanto la cooperación internacional es esencial para el control de este cuadro clínico.

En la estimación mundial la Organización de las Naciones Unidas del SIDA (ONUSIDA) estima que hay 39.5 millones de personas que actualmente viven con VIH, la mitad de las infecciones están ocurriendo en mujeres y que cerca del 40% de los casos se da en adolescentes y adultos jóvenes.<sup>2-3</sup>

En contraste, México es un país que registra una prevalencia baja del (0.3%), sobre todo si se compara con países que registran cifras más elevadas, como Belice (2.1%), Guatemala (0.8%) y Estados Unidos (0.6%).<sup>4</sup>

La infección-enfermedad por VIH/SIDA es una afección crónica transmisible de tipo progresivo, en la cual se establece una relación muy diversa entre huésped y virus, que finalmente condiciona la aparición de procesos oportunistas, tumores, o ambos.

### 3.2 Descripción del virus

El VIH, es un virus que pertenece a la familia de los retrovirus, la cual está dividida en subfamilias, entre ellas los lentoviridae, causantes de la inmunodeficiencia y destrucción de las células que infectan lentamente pero de forma progresiva. En este subgrupo figuran los que provocan la enfermedad en los seres humanos: el VIH tipo 1 (VIH-1) descubierto en 1981 y el VIH tipo 2 (VIH-2) en 1983. La secuencia de aparición de los retrovirus se muestra en el cuadro 3.1.<sup>5,6,7</sup>

**Cuadro 3.1.** Secuencia del descubrimiento de los retrovirus.

<b>Año</b>	<b>Retrovirus</b>
1980	HTVL – I
1981	VIH-1
1983	VIH-2
1987	HTVL –V
1990	Partícula retroviral humana tipo A (Síndrome de Sjögren)
1990	<i>Espumaviridae</i>

Fuente: Lamotte.JA.2002.

El VIH-1 y el VIH-2 son dos virus diferentes que comparten ciertas características biológicas en común, tales como: igual modo de transmisión, mecanismos similares de replicación, producción de estados de inmunodeficiencia, etc. La característica más importante de estos virus es la riqueza de genes y proteínas reguladoras, que van a condicionar la complejidad de la infección virus-célula y, de ahí, la patogenia de la enfermedad.

#### 3.2.1 Serotipos del VIH-1

El VIH-1 se clasifica en dos grandes grupos: el M (main) y el O (outlier), el primero causante de la gran mayoría de las infecciones existentes hoy en día y del cual se conocen los siguientes serotipos: A, B, C, D, E, F, G, y H; el segundo localizado en cierta parte de África.<sup>8</sup>

#### 3.2.2 Serotipos del VIH-2

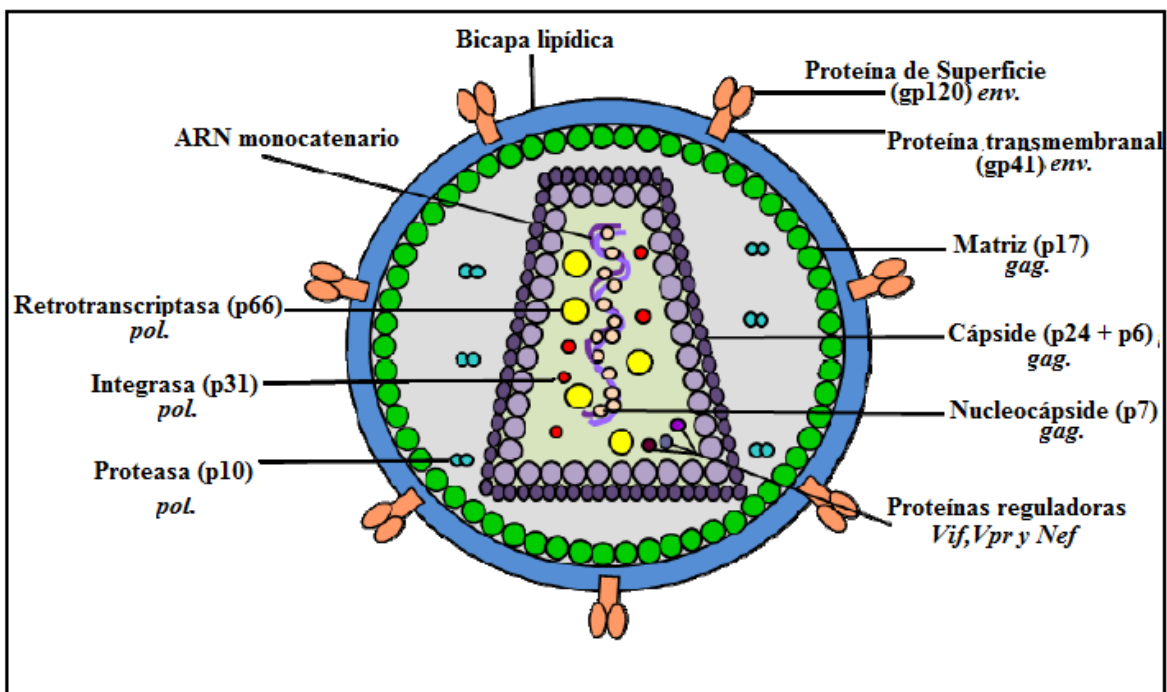
El VIH-2 por ser de menor circulación mundial, tiene pocos serotipos: A, B, C y E. En general, la familia de los retrovirus se asocia cada vez más con distintos procesos patológicos, tales como enfermedades autoinmunes (Síndrome de Sjögren), afecciones neurológicas y otras.<sup>8</sup>

El VIH infecta las células con receptor CD4, en especial a los linfocitos CD4 y los monocitos- macrófagos, lo cual trae como consecuencia una depleción lenta y progresiva de dichos linfocitos, a causa de la replicación viral dentro de ellos. El virus se replica constantemente: una fase es más alta que en la otra; se calcula que se produce entre 100 y 1000 billones de virus por día.

### 3.3 Estructura del VIH-1

Morfológicamente, los viriones del VIH-1 son esféricos y de aproximadamente 110 nm de diámetro. Están rodeados por una envoltura lipídica de origen celular que rodea la cápside icosaédrica viral. Dicha cápside o *core* contiene a su vez una nucleocápside helicoidal que alberga el material genético del virión, 2 hebras de ARN de polaridad positiva (figura 3.1).<sup>9</sup>

La envoltura viral está formada por una bicapa lipídica en la que se insertan las glicoproteínas gp120 y gp40. A continuación, se encuentra la matriz formada por la proteína p17 (MA o de la matriz), seguida de la cápside viral formada por la proteína p24 (CA o de la cápside) y estabilizada por la proteína p6. El material genético del virus se localiza dentro de la cápside viral en interacción con la proteína p7 (NC o de la nucleocápside). Además, las enzimas virales transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN) así como las proteínas reguladoras *Vif*, *Vpr* y *Nef* se encuentran en el interior de la cápside. La proteasa (PR) viral se encuentra entre la cápside y la matriz.<sup>9</sup>



**Figura 3.1.** Estructura del virión del VIH-1.

El genoma del VIH-1 consiste en una hebra de ARN de aproximadamente 9719 nucleótidos de longitud, lineal, no segmentada, de cadena sencilla y polaridad positiva. En cada partícula vírica hay dos copias idénticas de esta molécula de ARN genómico, cuyos extremos 5' están unidos entre sí por puentes de hidrógeno, lo que hace de la familia de los retrovirus los únicos virus animales cuyo genoma es diploide. Estructuralmente, el genoma del VIH-1 está formado por tres genes principales: *gag*, *env* y *pol* (figura 3.2). *Gag* y *env* codifican para las proteínas estructurales, mientras que *pol* codifica las enzimas virales esenciales para el ciclo replicativo. Adicionalmente, alrededor de la región de *env*, se sitúan en diferentes marcos de lectura las regiones codificantes de las proteínas reguladoras *Tat*, *Rev*, *Nef*, *Vif*, *Vpr* y *Vpu*. El genoma del VIH-1 se encuentra flanqueado en ambos extremos

3' y 5' por las regiones LTR (Long Terminal Repeat), que desempeñan un papel crucial en la replicación del genoma viral así como en su integración al genoma de la célula hospedadora.<sup>10</sup>

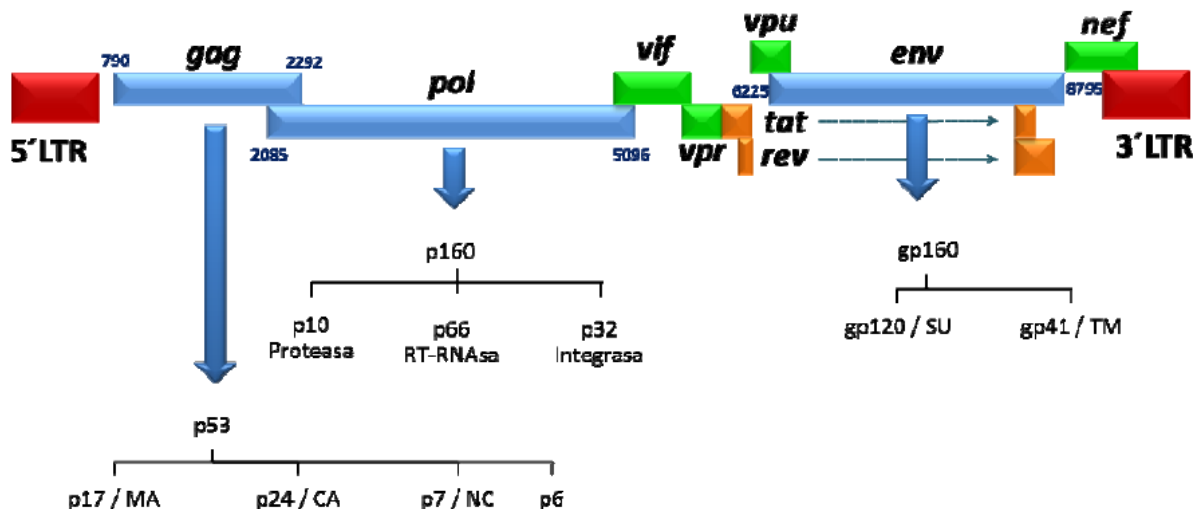


Figura 3.2. Estructura del genoma del VIH-1.

En el cuadro 3.2 se muestra los diferentes genes que codifican para las distintas proteínas del virus, así como su función.

El gen *pol* codifica para una proteína de 99 aminoácidos (aa) que para poder funcionar debe de unirse a otra molécula igual de 99 aminoácidos y formar la proteasa propiamente dicha, es decir, es una molécula homodimérica la cual participa en la síntesis del ADN y su integración en el genoma celular. Esta actúa durante las etapas tardías o avanzadas de la replicación viral, cuando la nueva partícula viral está saliendo de las células o poco después de su salida.<sup>11</sup>

El gen *gag* es una poliproteína estructural primaria del VIH, la cual es necesaria para la formación de partículas del virus, se compone de cuatro dominios estructurales: la matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC) y el *pol*. Entre las principales funciones del *gag*, es la de construir la mayor parte de estructura del virión participando en la síntesis de ADN y su integración, además de contribuir al ensamblaje de las partículas víricas y su salida de la célula.<sup>11-12</sup>

El gen *env* codifica las glicoproteínas de envoltura, que serán sintetizadas como un gran precursor que luego es cribado dejando una proteína transmembranal (gp 41). En esta molécula en su parte externa posee el sitio de unión para la molécula CD 4 (gp 120). Esta proteína posee otros sitios para la infectividad del virus, el más conocido V3 *loop* o bucle, principal epítipo neutralizante y sitio que promueve la unión al receptor CD4.<sup>11-12</sup>

El genoma del VIH contiene otros genes *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* y *vpu*, encargados de la regulación de la síntesis y de la organización de las partículas virales infecciosas.<sup>11-12</sup>

**Cuadro 3.2.** Genes del VIH-1, proteínas y función biológica.

Gen	Proteína	Función
<i>Gag</i>	p24 (CA)	Proteína estructural que forma la cápside viral.
	p17 (MA)	Proteína estructural que forma la matriz.
	p7 (NC)	Nucleoproteína asociada a las moléculas de ARN genómico.
	p6	Proteína implicada en la liberación del virión.
<i>Pol</i>	p10 (PR)	Proteasa viral. Interviene en el procesamiento post-traducciona de <i>gag</i> y <i>gag-pol</i> .
	p66(RT)	Transcriptasa inversa. Con actividad polimerasa y RNAsa. cataliza la copia del ARN viral genómico monohebra a ADN bicatenario.
	p31(IN)	Integrasa viral. Encargada de integrar el ADN proviral en el genoma de la célula huésped.
<i>Env</i>	gp120 (SU)	Proteína de superficie de la envoltura. Interacciona con la molécula CD4 y los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4.
	gp 41 (TM)	Proteína transmembranal de la envoltura. Implicada en el anclaje de gp120 y en la fusión de las membranas viral y celular.
<i>Tat</i>	Tat	Factor de transactivación. Crítica para el inicio y elongación de la transcripción.
<i>Rev</i>	Rev	Regulador del transporte y procesamiento del ARNm viral.
<i>Nef</i>	Nef	Regulador negativo de CD4 y MHC-1 en la membrana celular.
<i>Vif</i>	Vif	Factor de infectividad viral que inhibe la acción de las proteínas antivirales celulares.
<i>Vpr</i>	Vpr	Implicada en la integración del genoma viral, la transactivación de genes del hospedador y en la parada del ciclo celular.
<i>Vpu</i>	Vpu	Implicada en el bloqueo de CD4 en el retículo endoplásmico para evitar la interacción prematura con gp120 de nueva síntesis.

La gp120 (glicoproteína de superficie) es una glicoproteína que forma parte de la membrana externa del virus, que es un componente esencial en la entrada de múltiples virus. Se presentan como picos de la membrana viral que consiste en tres moléculas de gp 120 unidos entre sí y anclados en la membrana de la proteína gp41. La proteína gp120 es esencial para la infección viral, ya que facilita la entrada del VIH en la célula huésped.<sup>11-12</sup>

La gp41 es una proteína transmembranal de la cubierta del virus de VIH que es codificada por el gen *env*. Contiene residuos muy hidrofóbicos en un segmento corto de la parte N terminal. Esta región es importante porque permite que la membrana del virión se funda con la membrana celular y permita la entrada del virus a la célula. Además de la región de fusión, hay un segundo dominio hidrofóbico en la mitad de la gp41, el cual sirve para anclar las proteínas a la doble capa de lípidos de la envoltura viral.<sup>11-12</sup>

La p24 es una proteína nuclear principal del VIH codificada por el gen *gag* del VIH. La cual se encarga de formar la cápside del virus.<sup>11-12</sup>

La p17 constituye la matriz del VIH-1 situado bajo la envoltura, a la que estabiliza. Es una proteína estructural que puede actuar en el medio extracelular para regular varias funciones de las células inmunes a través de su extremo amino con un receptor de superficie celular, esta se genera a lo largo del ciclo viral y juega un papel crítico en la replicación al ser liberada por las células infectadas en el espacio extracelular.<sup>11-12</sup>

Las proteínas p6 y p7 forman la nucleocápside. La región de la p55 corresponde al péptido 6 es responsable de la incorporación de la primera proteína accesoria *vpr* al virión en formación y de la interacción con la membrana de la célula que hace posible la gemación. La p7 es responsable del reconocimiento y la incorporación del ARN al virión y además interviene facilitando la transcripción inversa.<sup>11-12</sup>

### 3.4 Ciclo replicativo del VIH-1

El ciclo replicativo del VIH-1 se puede dividir en:

- **Entrada del virus en la célula diana.** El VIH-1 inicia su ciclo replicativo mediante la unión entre la glicoproteína viral gp120 y el receptor celular CD4. Seguidamente, el complejo CD4-gp120 interacciona con CCR5 o CXCR4, provocando un cambio conformacional en la glicoproteína gp41 que promueve la fusión entre las membranas viral y celular, liberándose la cápside viral en el interior celular.
- **Decapsidación.** Consiste en la degradación de la cápside viral en el citosol, lo que provoca la liberación de su material genético.
- **Transcripción reversa.** Constituye el procesamiento del genoma viral desde ARN monohebra a ADN bicatenario, también llamado proviral. Esta etapa está catalizada por la enzima viral retrotranscriptasa (RT), siendo también importantes las acciones de la proteína viral *Vif*, que aumenta la eficacia de la retrotranscripción, y *Nef*, que inhibe la actuación de la proteína celular.
- **Integración.** El complejo de preintegración del núcleo se forma en el citosol a partir del ADN viral bicatenario, la integrasa, la RT, la matriz, *Vpr* y la proteína celular

HMG-1. Este complejo migra al núcleo, donde la integrasa inserta el material genético viral en el celular. Tras su integración, el VIH puede permanecer latente, o bien iniciar su replicación masiva con el consiguiente efecto citopático.

- **Transcripción y procesamiento del ARN mensajero.** Algunos transcritos del ADN proviral integrado son procesados y transportados al exterior del núcleo, donde dan lugar a las proteínas tempranas *Tat*, *Rev* y *Nef*. Alcanzados ciertos niveles de dichas proteínas, *Rev* facilita el transporte del resto de transcritos al citosol, donde se traducen de forma masiva.
- **Síntesis, circulación y procesamiento de las proteínas.** En el retículo endoplásmico, se sintetiza la proteína viral *env* (gp160), que oligomeriza en trímeros y es glicosilada. Tras su rotura proteolítica en el aparato de Golgi, *env* produce un complejo trimérico de dos glicoproteínas asociadas no covalentemente (TM-SU)<sub>3</sub>. Estos trímeros TM-SU (gp41-gp120) son transportados a la membrana plasmática celular, donde se integran. Su endocitosis es responsable de la escasa incorporación de *env* en las partículas virales, lo que contribuye a la eficiente evasión de la respuesta inmune del hospedador, así como a reducir la citopatogenicidad. Durante esta fase, *Nef* secuestra las moléculas CD4 y MHC-1 de la membrana celular, evitando la presentación de antígenos virales en la superficie celular. Otros ARNm dan lugar a la poliproteína *gag* y, por cambio de marco de lectura y en menor proporción (5% de los casos), a *gag-pol*. Ambas poliproteínas se asocian a la membrana celular a través de la interacción con la cola citoplásmica de TM (gp41).
- **Ensamblaje.** Fase en la que las proteínas y moléculas de ARN virales se aproximan a la membrana celular para la formación del virión.
- **Gemación.** Una extensión de la membrana celular que contiene los componentes virales agrupados en la fase anterior se separa del resto de la célula dando lugar al nuevo virión.
- **Maduración.** Liberado el virión de la célula infectada se activa la proteasa viral que procesa las poliproteínas *gag* y *gag-pol*, dando lugar a las proteínas estructurales MA, CA, NC y p6, cuyo reordenamiento formará la partícula viral madura.<sup>13</sup>

### 3.5 Entrada del VIH-1 en la célula

La entrada del VIH-1 en la célula diana es un proceso que consta fundamentalmente de tres etapas como se observa en la figura 3.3.

I. Unión de la glicoproteína de la envuelta gp120 al receptor celular CD4. El contacto inicial entre el virus y la célula ocurre por interacciones electromagnéticas inespecíficas entre gp120, cargada positivamente, y proteoglicanos de la membrana celular, cargados negativamente. Además ciertas lectinas de la superficie celular como DC-SIGN interactúan específicamente con el virus, aumentando la eficiencia de infección. Producida la aproximación entre virus y célula, tiene lugar la interacción entre la glicoproteína viral gp120 y el receptor celular CD4, receptor celular primario del VIH-1 que se expresa en monocitos, macrófagos, células dendríticas y en varios subgrupos de células T. Dicha interacción produce un cambio conformacional en la estructura de gp120. En primer lugar, 2 grupos de láminas  $\beta$  virales que estaba separadas en el espacio, se agrupan formando un dominio denominado bridgingsheet.<sup>14</sup>

En segundo lugar, las regiones V1, V2 y V3 se desplazan quedando más accesibles para su posterior interacción con la célula. En tercer lugar, la orientación de gp120 varía, de modo que el bridgingsheet y la región V3 se orientan hacia la membrana celular, mediando la sucesiva interacción con el receptor secundario o correceptor.

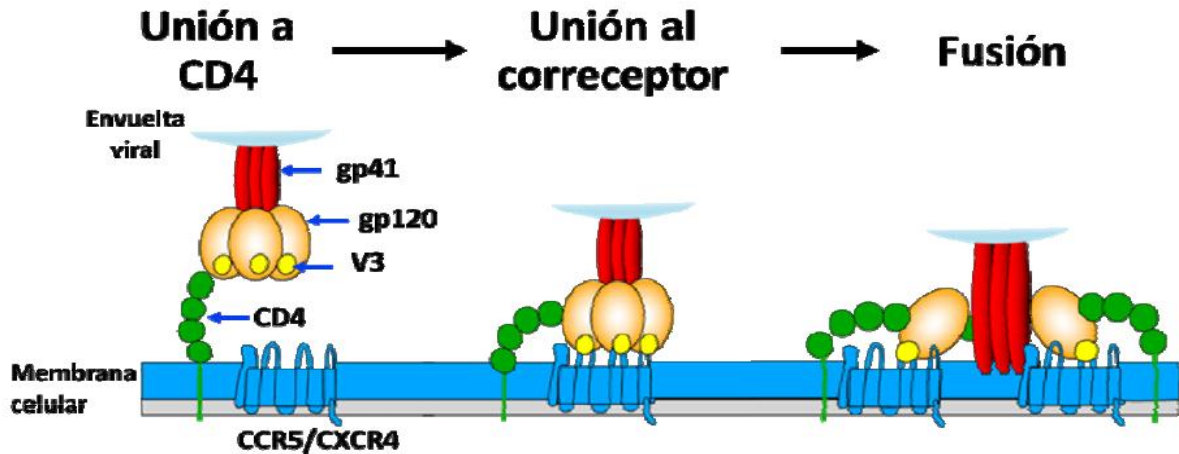


Figura 3.3. Proceso de entrada viral del VIH-1

II. Interacción del complejo CD4-gp120 con los receptores CCR5 o CXCR4. Los principales correceptores o receptores secundarios utilizados por el VIH-1 para la entrada viral in vivo son los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, ambos miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G. CXCR4 son proteínas integrales de membrana con 7 hélices transmembrana, un dominio N-terminal extracelular y 3 lazos extracelulares (extracellular loop; ECL) que forman un pequeño bolsillo. La interacción entre gp120 y el correceptor celular CCR5 ocurre a 2 niveles: entre el dominio N-terminal del correceptor que interacciona con el bridgingsheet y la base del lazo V3 viral, y también entre el segundo lazo extracelular (ECL2) del correceptor que interacciona con la corona del lazo V3 viral. La afinidad y dependencia relativa del virus hacia el ECL2 o la zona N-terminal de CCR5 varía en los diferentes virus que interaccionan con CCR5, también llamados R5-trópicos.<sup>14</sup>

La unión de gp120 con CXCR4 parece ocurrir de un modo muy similar, a pesar de que el dominio V3 de los virus que interaccionan con CXCR4 (X4-trópicos) tienda a estar más cargado positivamente, especialmente en los aminoácidos 11, 24 y 25.

III. Fusión de las membranas viral y celular. La unión de gp120 con el correceptor celular CCR5 o CXCR4 provoca nuevos cambios conformacionales en el heterotrímero viral, particularmente en la glicoproteína gp41. Dicha proteína expone su región N-terminal o péptido de fusión, el cual se inserta en la membrana celular de la célula huésped. Tras dicha inserción, los dominios HR1 (heptadrepeat 1) y HR2 (heptadrepeat 2) de gp41 sufren un reordenamiento energéticamente muy favorable en el que uno se pliega sobre el otro, acortando las distancias entre las membranas viral y celular.

En un heterotrímero viral funcional esto provoca la formación de un complejo de 6 hélices (six helix bundle) donde los 3 dominios HR1 forman una hélice central alrededor de las cuales se enrollan los dominios HR2 en dirección antiparalela.



Este reordenamiento estructural produce un acercamiento entre la región de la gp41, que está insertada en la envuelta viral, y el péptido de fusión, que está insertado en la membrana celular. Dicha yuxtaposición conduce a la formación del poro de fusión, lo que permite que la cápside viral se introduzca en el interior celular.<sup>14</sup>

### 3.6 Primoinfección VIH

Una vez que el VIH penetra en el organismo humano, por los mecanismos de transmisión actualmente reconocidos, inicia una replicación activa a consecuencia de la cual se desarrolla el cuadro clínico de la primoinfección, que suele ser asintomática o bien su sintomatología es tan leve que suele pasar desapercibida. Puede manifestarse como un síndrome mononucleósico asociado o no a una meningitis, meningoencefalitis aguda o subaguda de tipo linfocitario, neuropatía central o periférica, depresión transitoria de la inmunidad celular. Las técnicas de PCR cualitativa pueden detectar en esta fase al VIH. Su cuantificación durante este momento de la infección permite valorar la evolución posterior de la misma. Durante esta fase y no antes de las 3-6 semanas después del contagio "período ventana" (Figura 3.4), la infección puede ponerse de manifiesto serológicamente mediante la detección de los antígenos del virus, concretamente del antígeno p24 libre, por técnicas de EIA. La aparición de anticuerpos suele acontecer alrededor de los 2-4 meses después de la exposición al virus, y salvo en raras ocasiones, persistirán durante toda la vida. A medida que aumenta el título de anticuerpos específicos frente a las proteínas de envoltura y de core, se produce una disminución paulatina de la concentración sérica de antígeno p24 libre hasta su total negativización en las técnicas de EIA, pero con frecuencia en los niños y ocasionalmente en los adultos coexisten títulos altos de antígeno y de anticuerpo.<sup>14</sup>

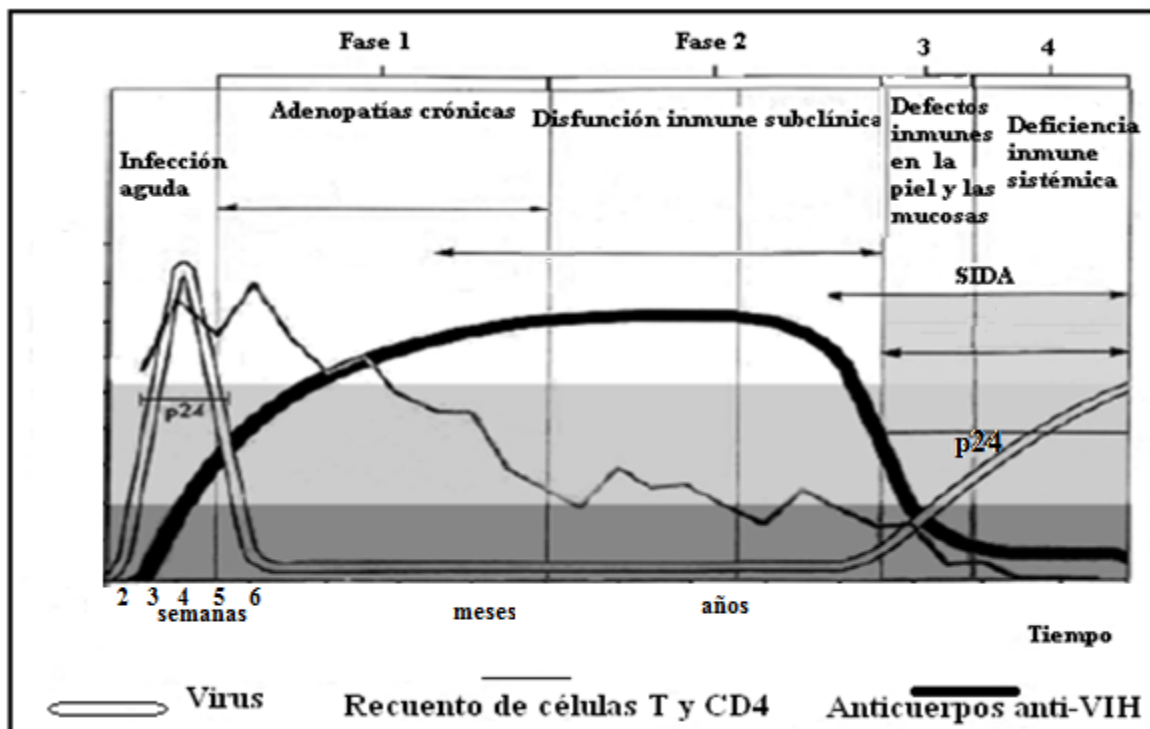


Figura 3.4. Comportamiento serológico del virus.

### 3.7 Pruebas diagnósticas para el VIH

Las pruebas de diagnóstico en medicina se emplean para identificar a aquellos pacientes con una enfermedad y a aquellos que no la tienen. Existen dos tipos de pruebas que se utilizan en la práctica clínica diaria para diagnosticar enfermedades, unas son las evaluaciones completas, que como su nombre lo dice, tienen el objetivo de hacer una investigación exhaustiva del paciente, para establecer un correcto diagnóstico; se caracterizan principalmente por ser muy específicas, pero desafortunadamente requieren de mucha inversión de tiempo así como de recursos materiales y económicos. Por otra parte están las pruebas de tamizaje son menos específicas, teniendo una gran ventaja de ser en su mayoría pruebas estandarizadas que se caracterizan por ser rápidas, con un costo mínimo y fácilmente reproducibles.<sup>15</sup>

Existen pruebas de tamizaje de anticuerpos anti-VIH, las denominadas pruebas rápidas, han experimentado un desarrollo importante, los anticuerpos que emplean son similares a los que utilizan los enzimo-inmunoanálisis, combinados con otras técnicas de detección de anticuerpos constituyendo una estrategia que mejora la especificidad de los resultados.<sup>15</sup>

Cuando se analizan los resultados de la prueba de tamizaje, debe tenerse en cuenta la posibilidad de falsos positivos por otros trastornos, la posibilidad de falsos negativos en la fases iniciales o finales por la falsa producción de anticuerpos, infecciones silenciosas que cursan con la replicación viral pero sin desarrollo de anticuerpos, las limitantes de la prueba para detectar variantes como grupo 0 o para detectar VIH-2.

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

Las pruebas de laboratorio empleadas para diagnosticar la infección por retrovirus humanos, se clasifican en directas e indirectas<sup>16-17</sup> (Cuadro 3.3).

**Cuadro 3.3** Clasificación de los métodos diagnósticos para el VIH

<b>Métodos Directos</b>	<b>Métodos Indirectos</b>
Antigenemia p24	Detección de anticuerpos específicos
Cultivo viral	Detección de ácidos nucleicos: PCR etc.
	Pruebas de escrutinio: serología VIH, ELISA, aglutinación etc.
	Pruebas de confirmación: WB, IFI, RIPA etc.
	Investigación de la inmunidad celular específica.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, WB: Western blot, IFI: Ensayo por Inmunofluorescencia Indirecta, RIPA: Ensayo por Radio Inmunoprecipitación.

### 3.8 Métodos directos

Facilitan el diagnóstico precoz de la infección, permiten detectar la presencia del virus o sus constituyentes (proteínas y ácido nucleico), aun antes de desarrollarse la respuesta de anticuerpos contra ellos, siendo muy costosos, entre estas pruebas se tienen:

- La detección o el aislamiento del virus entero, mediante cultivo de linfocitos infectados; la técnica es muy laboriosa además de lenta.
- La presencia en sangre de antígenos del virus (antígeno p24) es temprana tras la primera infección, para desaparecer progresivamente con la presencia de los anticuerpos y volver a resurgir con la evolución de la enfermedad.<sup>16-17</sup>

#### 3.8.1 Determinación de Ag por ELISA

El modelo de Sandwich es el método más frecuente para la determinación de Ag, el Ac específico para el Ag de interés, se encuentra adsorbido en un soporte sólido (placa), sobre el que se añaden las muestras. En el caso de que las muestras presenten el Ag, quedará capturado en la placa y será puesto en evidencia tras la adición del otro Ac específico conjugado en la enzima, por último se añade el sustrato incoloro que, por acción de la enzima, dará un producto coloreado el cual se mide espectrofotométricamente (Figura 3.5).



Figura 3.5. Técnica sandwich por ELISA directa.

#### 3.8.2 Marcadores séricos específicos de la infección VIH

En la actualidad existen marcadores séricos que permiten una mejor caracterización de la infección VIH, uno de ellos lo constituye una de las proteínas estructurales del *core* de VIH-1, denominada proteína p24 o Ag p24. Esta proteína aparece como consecuencia de la replicación del VIH en el organismo y puede detectarse en distintos momentos de la infección, constituyendo así otra importante ayuda diagnóstica. Así mismo, en el curso de la infección por VIH se producen anticuerpos específicos contra dicha proteína que sufren variaciones a lo largo del tiempo, ambos marcadores séricos son específicos de la infección por VIH y su manejo conjunto puede facilitar el mejor seguimiento de los individuos infectados.<sup>16,17,18</sup>

### 3.8.3 Antígeno p24

El antígeno p24 es la proteína de 24kd del núcleo viral y se produce de la división proteolítica, por acción de la proteasa viral, de la proteína precursora de 55 kd codificada por el gen *gag*. La respuesta de anticuerpos contra este antígeno (Ac anti-p24) se demostró por primera vez mediante RIPA, al ser la proteína de 24kd el antígeno inmunodominante del aislamiento viral reportado en el primer artículo científico que describe la infección por VIH-1.<sup>19</sup>

Es importante identificar marcadores de laboratorio que tengan capacidad para predecir la progresión clínica de la infección durante el estadio asintomático y puedan usarse independientemente de la clínica como marcadores sustitutivos, uno de estos es la detección del antígeno p24 (Ag p 24). Un estudio longitudinal prospectivo ha demostrado que la presencia de antigenemia p24 está asociada con la progresión de la infección por VIH y SIDA y es un indicador de pronóstico desfavorable. El antígeno p24 no es detectable en el suero de la mayoría de los individuos seropositivos en el periodo de latencia clínica, por lo que su aparición en individuos que comenzaron a recibir terapéutica antirretroviral cuando se encontraban asintomáticos y sin antigenemia detectable, indica que la terapéutica antirretroviral ha fallado. Los sistemas de ELISA para la detección del Ag p24 se han usado repetidamente en el monitoreo de la terapéutica antirretroviral.

La importancia del nivel plasmático del antígeno p24 ha tenido una vida azarosa; en un principio se valoró exclusivamente su positividad, pero dejaba mucho que desear; posteriormente se puso en duda su sensibilidad ya que su determinación se veía afectada en presencia de exceso de anticuerpos anti p 24 con los que se formaban complejos inmunes. Posteriormente surgió una técnica que determinaba el RNA (o DNA), la cual venció a la prueba de la determinación del antígeno p 24; sin embargo aún existen artículos que defienden la determinación del antígeno p 24 ya que este puede ayudar al pronóstico de supervivencia y de progresión a SIDA o muerte en enfermos infectados por VIH-1 y su validez se prolonga por lo menos 4 años como lo hace mención el estudio que se realizó sobre la supervivencia y progresión de la enfermedad en pacientes con VIH-1 que se publicó en el 2001.<sup>19,20</sup>

En el suero o plasma de los individuos infectados pueden detectarse concentraciones de Ag p24 medidas en picogramos (pg) mediante sistemas comerciales de ELISA. La sensibilidad de estos sistemas para la detección del antígeno depende de la afinidad de los anticuerpos fijados en la fase sólida para la detección y captura de los antígenos p 24 presentes en el suero de los individuos infectados, con los que forma complejos antígeno anticuerpo.<sup>20</sup>

Las variaciones de los niveles de antigenemia, expresada como concentración del antígeno en pg/mL constituyen también un marcador de la replicación del VIH.<sup>20</sup>

### **3.8.4 Reacciones Antígeno - Anticuerpo p24/anti p24.**

Existen diversas técnicas comerciales que utilizan el principio de EIA en triple "sandwich" para la detección de Ag p24. Las muestras clínicas en las que puede realizarse la detección son: suero, plasma y Líquido Cefalorraquídeo (LCR).

La aparición de Ag circulante libre y su persistencia es marcador de mal pronóstico y de progresión de la infección, y suele correlacionar bien con otros marcadores no específicos como el cociente de linfocitos CD4/CD8, la elevación de beta-2-microglobulina y neoproteína y los linfocitos totales. Los niveles elevados de antigenemia p24 se asocian con distinta frecuencia a la desaparición de Ac p55 y Ac p24 también de mal pronóstico. Por otra parte, la presencia de p24 puede demostrarse en LCR en diferentes estadios de la infección, como expresión de la multiplicación neurológica del virus.

La detección de Ag p24 para diagnóstico en el período ventana (figura 3.4) es de menor utilidad y debería reservarse sólo ante signos clínicos compatibles con la primoinfección en caso de exposición conocida o sospechada. Aunque existen referencias sobre detección de p24 antes de la sero-conversión, tanto en asintomático expuestos al virus, como en enfermos en el estadio I, en la mayoría de los casos la antigenemia primaria dura 1 o 3 semanas durante el período ventana. Los test del antígeno del VIH se puede utilizar para detectar la presencia de antígenos víricos y por lo tanto, para diagnóstico de infección por VIH. En el momento de la seroconversión, los anticuerpos específicos del virus forman complejos inmunes con los antígenos circulantes, de tal manera que tiene lugar una fuerte caída del índice de antígenos libres en la sangre y, eventualmente, la desaparición completa de estos antígenos. La antigenemia puede repararse más tarde en el curso de la progresión de la enfermedad.

En los casos tratados con quimioterapia antivírica específica para VIH la detección y cuantificación del antígeno p24 sirve para controlar la eficacia terapéutica del fármaco empleado y como marcador adicional para la monitorización del paciente. La detección de Ac p24 se realiza habitualmente mediante técnicas de EIA, la mayoría de estas utilizan péptidos recombinantes o sintéticos de p24.<sup>20,21,22</sup>

### **3.8.5 Cultivo Viral**

El aislamiento del VIH sigue siendo hoy en día una técnica de referencia, en el cultivo del virus a partir de muestras clínicas que contengan virus libres o células infectadas se utilizan linfocitos de sangre periférica separados mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Los linfocitos del paciente se cultivan a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en medios ordinarios (RPMI 1640 y 20% de suero de ternera fetal) adicionados de interleucina-2 junto con linfocitos de donante sano previamente estimulados con un mitógeno (fitohemaglutinina). En un determinado tiempo se añaden linfocitos estimulados de donante, manteniendo estas condiciones de cultivo durante 4 semanas. La detección del crecimiento vírico se puede realizar midiendo la actividad retrotranscriptasa en los sobrenadantes, por detección de antígenos específicos del virus (p24 principalmente) o bien mediante la demostración del efecto citopático en forma de sincitios o células gigantes formadas por la fusión de células infectadas, que tienen glicoproteínas de la envoltura del VIH en su superficie, con otras células contiguas.

### **3.9 Métodos indirectos**

Revelan la respuesta inmune por parte del huésped y están basadas en pruebas serológicas para la detección de anticuerpos en el suero. La presencia de anticuerpos anti VIH, lejos de reflejar una exposición y erradicación inmune del virus en el pasado, significa el estado de portador actual.

De forma indirecta se demuestra la respuesta del organismo frente a la infección por el VIH, es decir, la presencia de anticuerpos específicos contra el VIH. Estos métodos denominados serológicos son los más empleados en la práctica médica para la detección de la infección.

#### **3.9.1 Pruebas para la detección de anticuerpos específicos**

La producción de anticuerpos contra VIH ocurre después de un periodo inicial de intensa replicación viral, con altos niveles de RNA y antígeno p 24; se asume que como en todas las infecciones virales, primero aparece la inmunoglobulina M y, luego la G.

Las pruebas para la detección de anticuerpos contra el VIH se dividen en: pruebas de tamizaje o presuntivas, las cuales poseen una alta sensibilidad y buena especificidad, y las pruebas confirmatorias, cuya característica es la alta especificidad.

Las pruebas para la detección de anticuerpos pueden clasificarse de la siguiente manera, según su generación: pruebas de primera generación, que usan lisados virales como antígeno y que se acompañan de alta frecuencia de falsos positivos; pruebas de segunda generación, que usan proteínas recombinantes del VIH, péptidos sintéticos o ambos como antígenos; pruebas de tercera generación, que usan péptido/proteína recombinantes; y pruebas de cuarta generación, que se basan en la detección simultánea de anticuerpos y complejos inmunes antígeno/anticuerpo y tienen una alta sensibilidad y especificidad.<sup>23</sup>

El tiempo de positividad para las pruebas de anticuerpos de la tercera generación es de 20 días (IC 95%); las pruebas de cuarta generación disminuyen el tiempo de detección de 3 a 5 días. Con las de tercera y cuarta generación, el 50% de los infectados pueden detectarse en las primeras tres semanas en la infección, un 45% de los restantes en los primeros dos meses y el otro 5% en seis meses o más.<sup>23,24</sup>

Las muestras que se utilizan para la detección de anticuerpos son suero o plasma, aunque se dispone de pruebas que utilizan hisopado de mucosa gingival o yugal (saliva), orina o secreciones vaginales.

### **3.9.2 Pruebas rápidas para detección de anticuerpos**

Son muy útiles en situaciones de emergencia, como al momento del parto (cabe mencionar que lo ideal sería que durante el embarazo se monitoree desde el inicio para saber si hay infección y no al momento del parto) o en caso de accidentes con riesgo biológico. Debe tenerse en cuenta que son pruebas de tamizaje y que tiene las mismas limitaciones de detección en el período de ventana y que toda prueba reactiva debe confirmarse ya que su resultado es del tipo cualitativo.

### **3.9.3 Prueba de aglutinación de partículas para la detección de Ac**

Se basan en la unión de los anticuerpos del VIH presentes en el suero del paciente con pequeñas partículas que contiene antígeno del virus en la superficie, bajo el principio de reacción “tipo sándwich” de las pruebas de tercera generación, sabiendo que estas pruebas tiene un alta sensibilidad y, buena especificidad, por lo que son muy útiles como pruebas de tamizaje en áreas de limitados recursos, ya que son rápidas, simples y no requieren de equipos adicionales para su realización.<sup>23,24</sup>

### **3.9.4 Pruebas serológicas para la detección de antígeno**

En la infección temprana existe un corto período en el que hay presencia del antígeno p24 del VIH-1 en ausencia de anticuerpos contra el mismo. Este antígeno puede detectarse por técnicas de ELISA. Algunos métodos incorporan un ajuste al pH o tratamiento con calor para separar los complejos p24-anti p24 y, así, mejorar la sensibilidad de la prueba.<sup>23</sup>

Esta prueba tiene tres limitantes: en primer lugar la presencia de anticuerpos puede llevar a la detección de niveles bajos o a falsos negativos; la otra situación es la presencia de inmunoglobulina específica, anticuerpos similares al factor reumatoide, los cuales pueden hacer un puente entre el antígeno de captura y los trazadores, y causar detección en demasía o falsos positivos; el tercer problema es la baja sensibilidad de la prueba.

La estrategia diagnóstica ante la sospecha de primoinfección por VIH incluirá necesariamente la detección de anticuerpos totales y antígeno p24 libre en sangre con las siguientes consideraciones:

1) Un resultado negativo frente a los dos marcadores citados de infección VIH puede ser debido a:

**a)** La ausencia de infección.

**b)** El paciente está en el "periodo ventana". En ambas situaciones se procederá a la realización de determinaciones seriadas de anticuerpos y de antígeno a las 2 y 4 semanas y a los 3 y 6 meses para confirmar la ausencia o presencia de infección VIH.

2) Un resultado de anticuerpos negativo con presencia de antígeno p24 libre en sangre, es indicativo de infección reciente, probablemente durante las 8 semanas anteriores. Se procederá a realizar determinaciones seriadas de anticuerpos y antígeno siguiendo la pauta indicada en el punto anterior.

3) Un resultado de anticuerpo positivo con ausencia de antígeno libre circulante, es diagnóstico de infección VIH completamente establecida.

### 3.9.5 Quimioluminiscencia (Architec)

Es una técnica empleada para la determinación de anticuerpos VIH es la quimioluminiscencia, donde se obtiene energía luminosa a partir de una reacción química, la reacción se lleva a cabo entre un trazador y el sustrato, que son sustancias orgánicas con características luminiscentes que cuando se encuentran en un estado excitado, producen una emisión de luz estable hasta 30 minutos, por lo que favorece la toma de varias lecturas para obtener resultados más confiables y se aplica a un amplio rango de analitos.

En esta investigación se utiliza un equipo llamado Architec i2000 que es un analizador modular de inmunoensayos completamente automatizado que permite el acceso continuo y aleatorio así como procesos de reanálisis y de urgencia. (Figura 3.6).<sup>25</sup>



**Figura 3.6.** Modelo ARCHITEC i2000

Architec tiene un sistema que está constituido por tres componentes principales: centro y control del sistema, módulo de muestras y módulo de proceso; puede procesar hasta 200 pruebas por hora, entre las pruebas que puede determinar son las hormonas, perfil de TORCH, perfil de hepatitis, VIH, etc.



### 3.9.5.1 Fundamento

Se basa en el inmunoensayo que usa complejos de anticuerpo y antígeno como medio para generar un resultado perceptible. Un complejo anticuerpo: antígeno también es conocido como inmuno-complejo. Los inmunoensayos utilizan un anticuerpo selecto o más para detectar analitos de interés. Todos los inmunoensayos requieren el uso de material marcado para medir la concentración de antígeno o anticuerpo presente. Una marca es una molécula que reacciona como parte del ensayo, por lo tanto un cambio en la señal puede medirse en la sangre – reactivo. Las marcas incluyen un compuesto radioactivo, una enzima que hace que cambie el color de una solución, o una sustancia que produzca luz. La tecnología de ARCHITEC utiliza diferentes formatos para distinguir el complejo antígeno-anticuerpo.<sup>25</sup>

### 3.9.5.2 Prueba del VIH por el sistema Architec Ag/Ac combo

Es un inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas para la detección cualitativa simultánea del antígeno p 24 del VIH y de los anticuerpos frente VIH-1/VIH-2 en suero o plasma. El ensayo de la infecciones por el VIH-1 / VIH-2 y para el cribado de muestras de donantes de sangre y plasma. Un resultado reactivo del ensayo Architec VIH Ag/Ab Combo no distingue entre la detección del antígeno p 24 del VIH, el anticuerpo anti VIH-1 o el anticuerpo VIH-2.

Es un inmunoanálisis de dos pasos que utiliza la tecnología de inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas con protocolos flexibles, denominados Chemiflex, para determinar la presencia del antígeno p24 de VIH. El primer paso, se combinan la muestra, el tampón de lavado Architec i, el diluyente de ensayo y las micropartículas paramagnéticas.

El antígeno p 24 del VIH y los anticuerpos anti VIH-1 / VIH-2 presentes en la muestra se unen a las micropartículas recubiertas de antígeno del VIH-1 / VIH-2 y el anticuerpo anti p24 del VIH.

Después del lavado, el antígeno p24 del VIH y los anti - VIH-1 / VIH-2 se unen al conjugado de antígenos (recombinantes) del VIH-1 / VIH-2 marcados con acridinio, péptidos sintéticos del VIH-1 / VIH-2 marcados con acridinio y anticuerpos anti p24 del VIH marcado con acridinio. Las soluciones preactivadoras y activadoras se añaden a la mezcla de reacción después de otro ciclo de lavado. La reacción quimioluminiscencia resultante se mide en unidades relativas de luz (URL).<sup>25</sup>

Existe una relación directamente proporcional entre el antígeno del VIH y los anticuerpos anti VIH presentes en la muestra y las URL detectadas por el sistema Architec. La presencia o ausencia de antígeno p 24 del VIH o anticuerpos anti VIH-1 / VIH-2 en una muestra se determina comparando la señal quimioluminiscencia de la reacción con el valor del punto de corte determinado por la calibración del ensayo ARCHITEC VIH Ag/Ab Combo. Las muestras con valores para la señal respecto al punto de corte (S/CO) iguales o superiores a 1.0 se consideran reactivas para el antígeno p 24 del VIH o los antígenos anti VIH-1 / VIH-2.

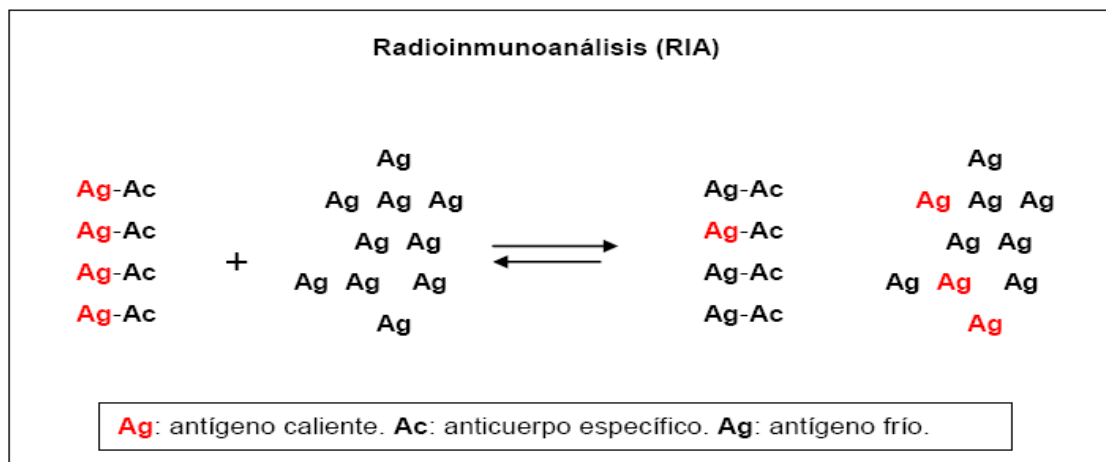
Las muestras con valores S/CO inferiores a 1.0 se consideran no reactivas para el antígeno p24 del VIH o a los anticuerpos anti VIH-1 / VIH-2.

Las muestras que son inicialmente reactivas con el ensayo Architect VIH Ag/Ab Combo se deben analizar de nuevo por duplicado después de ultracentrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos. La reactividad repetida es un indicio importante de la presencia del antígeno p 24 del VIH y de anticuerpos VIH-1 / VIH-2. Sin embargo, el ensayo Architect VIH Ag/Ab Combo puede producir reacciones inespecíficas debidas a otras causas, especialmente cuando se analizan muestras de poblaciones con prevalencia baja.<sup>25</sup>

### 3.9.10 Otras pruebas indirectas utilizadas para el diagnóstico del VIH

Los análisis inmunoenzimáticos son los métodos más utilizados, con los que se buscan la detección de anticuerpos frente al VIH en una muestra de sangre.

La técnica de radioinmunoanálisis (RIA) permite cuantificar la presencia de pequeñas cantidades de un determinado Ag o Ac en una muestra biológica. Es una técnica sumamente sensible, en la actualidad ha sido reemplazada por otras técnicas que no utilicen radioisótopos. La técnica se basa en la inhibición competitiva de la unión de un Ag marcado radioactivamente con su Ac específico por pares de Ags idénticos no marcados presentes en la muestra a analizar (Figura 3.7).<sup>26-27</sup>



**Figura 3.7.**Técnica de radioinmunoanálisis.

### 3.10.1 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) indirecta

La técnica de ELISA utiliza Ac marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa) para poder visualizar la reacción Ag –Ac. La técnica se utiliza para la determinación de Ag como de Ac. Para la determinación de anticuerpos específicos para un determinado antígeno se utiliza normalmente la modalidad de ELISA indirecta en donde el Ag de interés se encuentra adsorbido en la placa. Se pueden utilizar como antígenos, proteínas virales o bacterianas e incluso virus completos, es una de las técnicas de elección para buscar Acs contra proteínas del virus VIH en sueros (Figura 3.8).<sup>26,27</sup>



**Figura 3.8.** Técnica por ELISA indirecta.

### 3.10.2 Pruebas confirmatorias para la infección por el VIH

Como su nombre lo indica esta prueba es utilizada para confirmar la presencia de la infección por el VIH en un paciente con una prueba presuntiva doblemente reactiva, por lo que tiene una alta especificidad.

### 3.10.3 Western Blot

Es una técnica muy sensible que permite la identificación de anticuerpos, esta técnica se basa en la separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida, la transferencia (*blotting*) de dichas proteínas a un soporte sólido (membranas de nitrocelulosa o nylon) y la posterior detección de una o más bandas identificadas por anticuerpos específicos. La migración de las proteínas se realiza en presencia de detergentes (Dodecil Sulfato de Sodio, SDS) a fin de que su migración dependa fundamentalmente de peso molecular de los péptidos.

La técnica de Western blot para la determinar la especificidad de los anticuerpos contra el antígeno del virus del VIH es la prueba confirmatoria de elección.<sup>28</sup>

El procedimiento comprende los siguientes pasos:

- Rehidratación de la tira.
- Incubación de las muestras a confirmar y sueros control.
- Lavar e incubar los anticuerpos anti-Ig G humana marcados con fosfatasa alcalina.
- Adicionar del conjugado donde se une a los anticuerpos anti VIH-1 capturados en la fase sólida.
- Lavar y retirar el exceso de conjugado, adicionar la solución de revelado del color que permite demostrar la actividad enzimática de los complejos unidos a la nitrocelulosa.
- El aspecto de las bandas coloreadas permite demostrar la presencia de anticuerpos anti VIH-1 en la muestra.

Para esta investigación de igual forma que se utilizó el equipo Architec para la prueba de escrutinio en los casos para la prueba de confirmación se utilizó un equipo llamado Autoblots 3000.

### 3.10.3.1 Autoblots 3000

Es un equipo automatizado para la prueba de Western blot, después de añadir las muestras manuales, el Autoblots incuba, lava y realiza las adiciones de los reactivos (Figura 3.9).



**Figura 3.9.** Modelo Autoblots 3000.

El reactivo New Lav-blot 1 está diseñado para la detección de anticuerpos humanos anti VIH-1 en el suero o en el plasma mediante inmunotransferencia para confirmar una respuesta positiva anti VIH-1 y determinar su especificidad antigénica dentro del ámbito del diagnóstico del SIDA.<sup>28</sup>

La prueba se basa en una técnica de ELISA indirecta sobre una tira de nitrocelulosa que contiene todas las proteínas constituyentes del VIH-1 y un control interno anti Ig-G. Las proteínas del VIH-1 inactivas se separan de acuerdo con sus pesos moleculares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en medio disociativo y reductor, posteriormente se transfieren eléctricamente a una hoja de membrana de nitrocelulosa.

### 3.11 Confiabilidad de las pruebas diagnósticas

Las pruebas diagnósticas son de gran utilidad para la detección de nuevos casos, para confirmar o descartar un diagnóstico, o bien para medir o determinar el efecto de un tratamiento. El principio fundamental de las pruebas diagnósticas reside en la creencia de que los individuos que tienen una enfermedad son distintos de los que no la tienen y que las pruebas diagnósticas permiten distinguir a los dos grupos. Las pruebas diagnósticas, para ser perfectas, requieren que: 1) todos los individuos sin la enfermedad en estudio tuvieran un valor uniforme en la prueba; que todos los individuos con la enfermedad tuvieran un valor uniforme pero distinto en la prueba; 2) que todos los resultados de las pruebas fueran consistentes con los resultados del grupo de los enfermos y del de los sanos.

Hablar de pruebas diagnósticas implica determinaciones de laboratorio o exámenes de imagen, pero el término puede aplicarse también al valor diagnóstico de los signos y síntomas o la eficacia de instrumentos de aplicación, herramientas de gran utilidad en la investigación epidemiológica.<sup>29</sup>

Es por eso, que el punto de partida en una investigación es la seguridad de que las pruebas diagnósticas a utilizar son válidas. La validación de las pruebas diagnósticas tiene dos aspectos importantes: la confiabilidad o precisión y la exactitud. Ambos aspectos pueden ser determinados por pruebas estadísticas muy sencillas que sólo requieren de una cuidadosa recolección de los datos y es responsabilidad de los laboratorios de análisis clínicos determinar estos parámetros para garantizar que el resultado obtenido es correcto o confiable.

### **3.11.1 Confiabilidad o precisión**

La confiabilidad o la precisión es el grado de estabilidad que se presenta cuando una medición es repetida bajo condiciones idénticas, lo que viene siendo la reproducibilidad, y es fundamental para reflejar la cantidad de error aleatorio, inherente a una medición. Que un procedimiento sea confiable no es una garantía de validez, pues podemos estar cometiendo el mismo error sistemáticamente, por lo que el resultado es reproducible, pero lejano de la realidad. La falta de confiabilidad puede producirse por diferencias entre los observadores, los instrumentos de medición o la inestabilidad de los atributos a medir, es por ello que se deben realizar mediciones independientes para ser comparadas.<sup>29</sup>

Un punto clave en este tipo de pruebas es el nivel o punto de corte para diferenciar a los sanos de los enfermos, haciendo a la prueba válida y confiable.

### **3.11.2 Pruebas de validez para variables cualitativas**

Para determinar la validez, utilidad o eficacia, tanto de pruebas de tamizaje como de las diagnósticas, se utilizan cuatro índices: sensibilidad (S), especificidad (E) y los valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN), parámetros que nos indican la utilidad o eficacia diagnóstica del procedimiento o instrumento a utilizar. La sensibilidad y especificidad de una prueba de diagnóstico señalan la eficacia de esta para establecer o descartar un diagnóstico determinado.<sup>29</sup>

La utilidad de una prueba diagnóstica se basa en la comparación con una prueba o criterio que define inequívocamente una enfermedad, esta es conocida como prueba “estándar de oro”. El uso del criterio de oro es con el fin de identificar definitivamente a los que tienen la enfermedad de los que no la tienen. Es un requisito para examinar la utilidad diagnóstica de cualquier prueba nueva o no evaluada.

La sensibilidad es la capacidad de la prueba para identificar correctamente la presencia de la enfermedad, es decir, es la probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando el individuo realmente tiene la enfermedad, por lo que también se denomina tasa o fracción de verdaderos positivos. La especificidad es la capacidad de la prueba para identificar correctamente la ausencia de la misma, es decir, la probabilidad de que la prueba resulte negativa cuando el individuo en realidad no presenta el padecimiento, si esta fracción se resta 1 se obtendrá la tasa o fracción de falsos negativos.

De acuerdo con el investigador Jecicek menciona que no existe un nivel mágico de sensibilidad y especificidad que determine que una prueba sea aceptable, aunque algunos autores consideran que si los índices tienen un valor mayor a 80% son adecuados, sin justificación alguna. En general se busca una sensibilidad alta cuando la enfermedad es de mal pronóstico y no debe pasar inadvertida, y una alta especificidad cuando la enfermedad es de mal pronóstico e incurable.<sup>29</sup>

### 3.11.3 Valor predictivo de las pruebas

La sensibilidad y la especificidad son los parámetros más importantes para valorar una prueba y, en el caso de la ampliación clínica de las determinaciones del VIH, son cruciales los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN). La sensibilidad de los equipos actuales se aproxima al 100%, sin embargo, es bien conocido que el crecimiento de la sensibilidad lleva aparejado de un descenso de la especificidad (falsos positivos). Por otro lado, es conveniente señalar las dificultades de alcanzar una sensibilidad real del 100% en una infección en la que la seroconversión ocurre en un lapso de tiempo de 2 a 4 semanas en la mayoría de los casos y, a veces, puede alargarse hasta varios meses (periodo ventana). Sin embargo, los antígenos incluidos en las pruebas de detección de anticuerpos han ido variando a lo largo de los años y con ellos las técnicas han evolucionado incrementando la sensibilidad sin mermar de la especificidad.<sup>30</sup>

En el siguiente cuadro se muestra la sensibilidad y especificidad analítica de los reactivos utilizados en nuestra investigación para el diagnóstico de VIH.

**Cuadro 3.4.** Sensibilidad y especificidad analítica de las diferentes pruebas.

Prueba	Sensibilidad	Especificidad	Concentración min.
Quimioluminiscencia (Architec)	100%	99.5%	<50pg/mL
Antígeno p24	95%	99.9%	8pg/mL
Western blot	Positivo	96%	0%
	Indeterminado	4%	13%
	Negativo	0%	87%

La OMS determinó las estrategias diagnósticas a seguir en función de que se realicen distintas pruebas basadas en principios técnicos diferentes que utilizadas en combinación garanticen el resultado.<sup>31</sup>

Esta norma tiene por objetivo establecer y actualizar los métodos, principios y criterios de operación de los componentes del Sistema Nacional de Salud, respecto de las actividades relacionadas con la prevención y control, que abarcan la detección, el diagnóstico oportuno, la atención y tratamiento médico de la infección por el VIH.<sup>31</sup>

### 3.12 Causas de resultados indeterminados, falsos positivos y negativos

#### 3.12.1 Falsos positivos con las pruebas de confirmación

En la prueba WB se han descrito resultados indeterminados (Cuadro 3.5) y con el fin de reducir al mínimo los resultados indeterminados se han desarrollado las técnicas LIA, inmunoblots con péptidos recombinantes. La principal ventaja de esta técnica es la lectura más estructurada que puede hacerse mediante densitometría en algunos casos, con lo cual se obvian la subjetividad del WB. Su desventaja es que, al no poseer el LIA trazas de impurezas celulares y de otras proteínas que acompañan a los extractos purificados del VIH del WB, se pierde la posibilidad de observar bandas de reactividad que pudieran explicar reacciones aparecidas en las pruebas de tamizaje.

El empleo de dos técnicas de tamizaje de anticuerpos, de distinto principio técnico, permite descartar razonablemente un falso positivo, si a estas pruebas añadimos la realización de un WB puede eliminar la posibilidad de falsos positivos casi en su totalidad, como ya se ha comentado, un falso positivo genera muchos más problemas, pues obliga a realizar confirmaciones con una mayor frecuencia, de aquí la importancia de determinar también el antígeno p24.<sup>32</sup>

**Cuadro 3.5.** Causas de reacciones indeterminadas en la prueba de WB.

---

Una glicoproteína aislada (gp160, gp120 o gp41)

Posible causa

- Inicio de la seroconversión
- Infección por otros tipos de VIH
- Hijos de madres infectadas

p 24 aislada

Posible causa

- Frecuente en indeterminados de mujeres embarazadas
- Multitrasfundidos
- Pacientes africanos

---

P17 aislada

- Causa desconocida no es necesario seguimiento

---

Otras bandas del core aisladas o bandas no víricas

Posible causa

- Multitrasfundidos
  - Enfermedades autoinmunes
-

### 3.12.2 Falsos resultados en el diagnóstico serológico de la infección por VIH

Los problemas que se presentan en el diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana adquieren una mayor importancia por las posibles consecuencias y la trascendencia clínica de la infección.<sup>32,33</sup>

Es necesario alertar sobre la posibilidad de los falsos negativos en el diagnóstico y determinación de anticuerpos anti – VIH. La frecuencia de falsos negativos es menor que la de falsos positivos, los resultados falsos negativos no son reconfirmados si no existe una indicación clínica precisa. Las causas de la negatividad en esta determinación son también variadas. Los falsos negativos pueden constituir sólo una rareza o excepción entre los infectados por el VIH seronegativos, debido a causas orgánicas derivadas de una respuesta anormal a la infección o bien por el intenso deterioro inmunitario.

Determinadas circunstancias inherentes a la evolución serológica de la infección pueden condicionar la aparición de resultados erróneos. Este es el caso de los estadios iniciales y finales de la infección. Estos últimos pueden desaparecer los anticuerpos contra algunas de las proteínas estructurales internas del virus (p24, p17, p55, etc.). En el otro extremo, tras la primoinfección, se sucede un lapso de tiempo conocido como periodo de ventana de dos a cuatro semanas de duración, caracterizado serológicamente por la ausencia de anticuerpos y la presencia de antígeno p24, proteína mayoritaria del *core* del VIH. De ahí la importancia de desarrollar protocolos que permitan el diagnóstico en el momento de la infección aguda, ya que este periodo se relaciona con la máxima infectividad. Es muy apropiada la adopción de técnicas EIA para detección simultánea de anticuerpos y antígeno p24 con una alta probabilidad de detectar seroconversiones.<sup>32,33</sup>

#### **Cuadro 3.6. Causas de falsos negativos en la determinación de anticuerpos anti VIH.**

---

##### **Fallos en el principio técnico**

---

Fallos en el proceso de fabricación del equipo de diagnóstico

Infección por tipos de VIH no detectables

Inmunosupresión

Periodo de ventana

Respuestas anormales ante la infección VIH

Terapia inmunosupresora prolongada

Trasplante de médula ósea

Disfunciones en los linfocitos B

Neoplasias

---

En el laboratorio tienden a preocupar resultados falsos positivos, tanto en las pruebas de escrutinio como en las de confirmación (menos frecuente), sobre todo cuando éstos se producen en personas sin ningún factor de riesgo. Las causas de falsos positivos son variadas y dependen básicamente de dos elementos: las condiciones derivadas del paciente y la técnica (antígenos y principio técnico empleado) (Cuadros 3.5 y 3.6).<sup>33</sup>



**Cuadro 3.7.** Causas de falsos positivos en las pruebas de detección de anticuerpos VIH relativas al suero.

---

**Errores de extracción e identificación**

---

Aspecto lipídico o turbio del suero  
Contaminación microbiana  
Almacenamiento a temperatura Subóptima  
Sueros tratados con calor (>60°C)  
Congelaciones y descongelaciones repetidas.

---

**Cuadro 3.8.** Causas de falsos positivos en la determinación de anticuerpos VIH relativas a los auto anticuerpos.

---

**Personas con anticuerpos anti HLA- DR4**

---

Enfermedades reumatoides  
Polimiositis  
Lupus eritematoso  
Multitransfundidos  
Trasplantes renales  
Multíparas

---

Dada la existencia de falsos positivos y falsos negativos deberá confirmarse mediante una reacción de bloqueo con anti p24 y debido a que existen varios casos en los que se tienen resultados de Western blot indeterminados con una prueba de escrutinio negativa o bien en la prueba de escrutinio positiva y la prueba de Western blot negativa, se vuelve muy importante determinar la sensibilidad de la prueba de escrutinio a través de la prueba del antígeno p24, para así asegurar que los resultados falsos negativos o falsos positivos realmente corresponden a un paciente no infectado o infectado respectivamente.

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, al igual que en el resto de los países del mundo, el VIH se ha convertido en un problema prioritario de salud pública muy complejo, con múltiples repercusiones psicológicas, sociales, éticas, económicas y políticas que rebasan el ámbito de la salud.

A finales del 2012 ONUSIDA estimó que a nivel mundial existen 39.5 millones de personas que viven con el VIH, del cual la región más afectada es África. A pesar de que América Latina tiene una epidemia más reciente, el número de infectados por VIH alcanzó la cifra de 2.5 millones de personas infectadas. Al cierre del 2012, la dirección general de epidemiología (DGE) reportó en México 4 mil 598 nuevos casos de SIDA y 4 mil 926 nuevas infecciones por VIH, lo cual habla de un diagnóstico temprano. ONUSIDA estima que en México viven actualmente 183 mil personas con VIH de las cuales el 48% desconocen su estatus serológico, por lo cual hay que fortalecer la detección del VIH.<sup>2</sup>

Debido a que la infección por el VIH es cada vez más común y en los últimos años esta infección ha sido considerada una pandemia, es importante diagnosticarla oportunamente; por ello en la actualidad existen marcadores séricos que permiten una mejor caracterización de la infección por VIH, uno de ellos constituye una de las proteínas estructurales del *core* de VIH-1, denominada proteína p24 o antígeno p24. Esta proteína aparece como consecuencia de la replicación del VIH en el organismo y puede detectarse en distintos momentos de la infección, constituyendo así otra importante ayuda diagnóstica y facilita también el seguimiento de los individuos infectados por VIH.

Dada la existencia de falsos positivos y negativos en los resultados de las pruebas de escrutinio, deberá confirmarse mediante una reacción de bloqueo las muestras con suero anti p24, con el fin de identificar resultados falsos, de ahí surge la necesidad de llevar a cabo la práctica experimental con muestras de pacientes con resultados indeterminados (WB) y muestras con resultados cercanos al punto de corte por el método de quimioluminiscencia (Architec) para probar la eficacia del antígeno p24, el cual es un marcador directo que nos muestra la presencia del virus en el organismo a diferencia de las pruebas de detección de anticuerpos, de ahí surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Tendrá la prueba directa de antígeno p24 una sensibilidad superior al 80% comparándolo con la prueba de escrutinio por quimioluminiscencia (Architec) y el Western blot?

## **V. OBJETIVOS**

- Determinar la presencia del antígeno p24 en muestras de pacientes con resultados discordantes entre la prueba de escrutinio y la prueba confirmatoria.
- Corroborar la concordancia entre los resultados de la prueba de escrutinio y el resultado del antígeno p24.
- Dar a conocer la utilidad de la determinación del antígeno p24 en la identificación de pacientes no seroconvertidos.
- Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de escrutinio a través de la presencia del antígeno p24.

## **VI. HIPÓTESIS**

Debido a las discrepancias existentes entre los resultados del Western blot y las pruebas de escrutinio durante el periodo de ventana de la infección de VIH, y siendo el antígeno p24 un marcador de infección reciente, suponemos que la determinación del antígeno p24 tendrá una sensibilidad diagnóstica superior al 80% con respecto al reactivo Architect Combo Ag-Ac para VIH.

## **VII. METODOLOGÍA**

### **7.1 Diseño de investigación**

El diseño fue observacional, transversal, prolectivo y comparativo.

### **7.2 Población**

Se estudiaron muestras de pacientes referidas del laboratorio Carpermor del mes de agosto del 2012 a febrero del 2013 que tuvieron resultados indeterminados o negativos en la prueba de Western blot y un resultado reactivo en la prueba de escrutinio, así como también resultados indeterminado en Western blot y no reactivo en escrutinio. A estas muestras se les procesó la determinación del antígeno p24 por el método de ELISA para el diagnóstico de infección por VIH.

### **7.3 Criterios**

- **Inclusión:** Todos aquellos pacientes con estudios en la prueba de escrutinio y la prueba confirmatoria que sus resultados fueron discordantes.
- **Exclusión:** Todos aquellos pacientes que cumplieron con la prueba de escrutinio y la confirmatoria congruente (verdaderos positivos y negativos).

### **7.4 Variables**

- **Western blot.** Resultado positivo o negativo de una muestra sérica para el diagnóstico de VIH.
- **Antígeno p24.** Resultado positivo o negativo de una muestra sérica para el diagnóstico de VIH.
- **Prueba de escrutinio.** Resultado positivo o negativo de una muestra sérica para el diagnóstico de VIH.

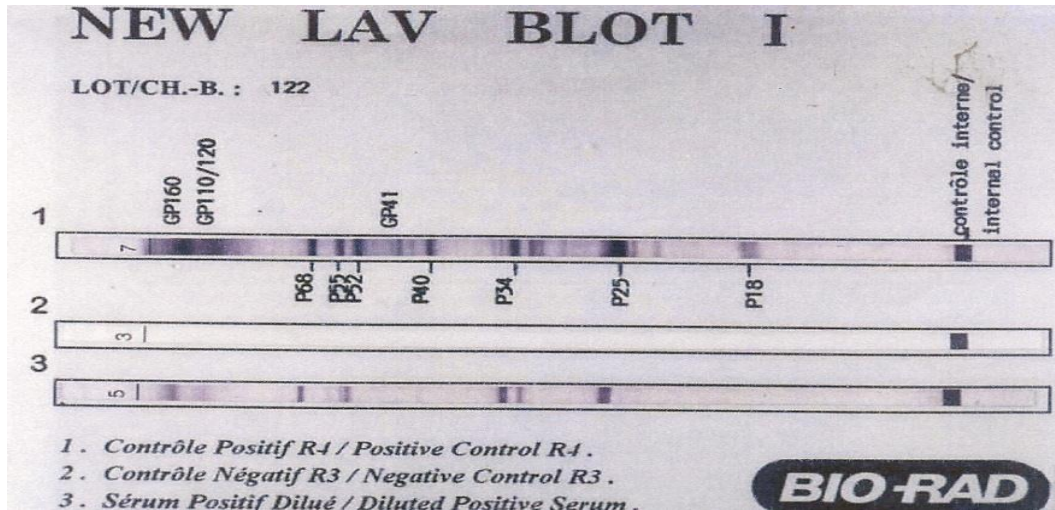
## 7.5 Método

- I. Se determinó la concordancia entre los resultados obtenidos de la prueba de escrutinio y la prueba de Western blot, seleccionando las muestras con resultados no concordantes.
- II. Se hicieron alícuotas de las muestras con resultados no concordantes (estas se mantuvieron en congelación a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de su proceso).
- III. Se determinó el antígeno p24 a 141 muestras obtenidas del periodo del mes de agosto del 2012 a febrero del 2013 mediante la técnica de ELISA con el reactivo de BIO –RAD.
- IV. Se realizaron los cálculos necesarios para conocer la positividad o negatividad respectivamente de las muestras al antígeno p24.
- V. Se calculó la sensibilidad de la prueba de escrutinio y se evaluó la presencia de falsos positivos y negativos, a través del antígeno p24 por el método de ELISA utilizando resultados de la prueba de escrutinio y de Western blot.

## 7.6 Procedimiento de la prueba de Western blot

1. Se llevó a cabo en el equipo Autoblot.
2. Antes de usar los reactivos fue necesario esperar 30 minutos para que estos se estabilizarán a temperatura ambiente.
3. Se colocaron tiras de nitrocelulosa cuidadosamente en la placa de soporte con pinzas de plástico.
4. Se rehidrataron las tiras evitando que estas se secan más de 10 minutos durante la prueba, se colocaron los controles en paralelo con las muestras.
5. Se añadió 2 mL de la solución de lavado/diluyente a cada celdilla, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente bajo agitación.
6. Se añadió 20 $\mu\text{L}$  de cada suero de muestra o control a la celdilla correspondiente, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente bajo agitación.
7. Se vació completamente el contenido de cada celdilla usando una bomba de vacío con un colector que contenga un desinfectante, se lavó cada tira con 2 mL de solución de lavado/diluyente reconstituida (lavado total 3 veces). Retirando la solución de lavado en el último lavado.
8. Se dispensaron 2 mL de conjugado a cada celdilla, la solución conjugada se estabilizó previamente a temperatura ambiente, incubación de 1 hora bajo agitación.
9. Se lavó con un total 3 veces (paso número 7).
10. Se dispuso 2 mL de solución de revelado a cada celdilla, se incubó durante 5 minutos bajo agitación y se vigiló el aspecto de la coloración. Se observó a todas las bandas (azul púrpura) correspondientes a las proteínas víricas del suero control positivo.

11. Se detuvo la reacción retirando la solución de revelado y enjuagando las tiras 3 veces con agua destilada.
12. Se secaron las tiras entre 2 hojas de papel absorbente a temperatura ambiente.
13. Finalmente se interpretaron los resultados (figura 7.1).



**Figura 7.1.** Bandas en tira reactiva de Western blot.

### 7.6.1 Validación de la lectura e interpretación de resultados

Para la validación se observó: 1) la banda de control interno anti Ig G que debe estar presente con un color fuerte, 2) el control positivo: están presentes todas las bandas correspondientes a las proteínas virales junto con la banda control y 3) el control negativo: no deben aparecer ninguna banda viral y únicamente está presente la banda control. Se interpretaron los resultados de acuerdo a lo descrito (Cuadro 7.1).

**Cuadro 7.1.** Interpretación de resultados.

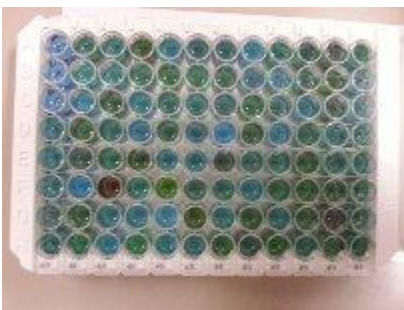
<b>Interpretación</b>	<b>*Criterios de la OMS</b>
Positivo	2 ENV + GAG + POL
Indeterminado	1 ENV + GAG + POL GAG + POL GAG POL
Negativo	Sin bandas Bandas no clasificadas

\*Criterios OMS: Organización Mundial de la Salud

## 7.7 Determinación del antígeno p24 por ELISA

La realización del test comprende las siguientes etapas:

1. Antes de usar los reactivos fue necesario esperar 30 minutos para que estos se estabilizaran a temperatura ambiente.
2. Las muestras, así como los sueros control, se distribuyeron en sus pocillos respectivamente, a los cuales se les añadió con anterioridad el diluyente de las muestras (en el caso que existan antígenos VIH-1 en la muestra sometida a este test, estos se fijan a los anticuerpos que están en los pocillos), el depósito de las muestras queda confirmado por un cambio de color del disolvente de las muestras, que pasa de un color verde azul.<sup>31</sup>



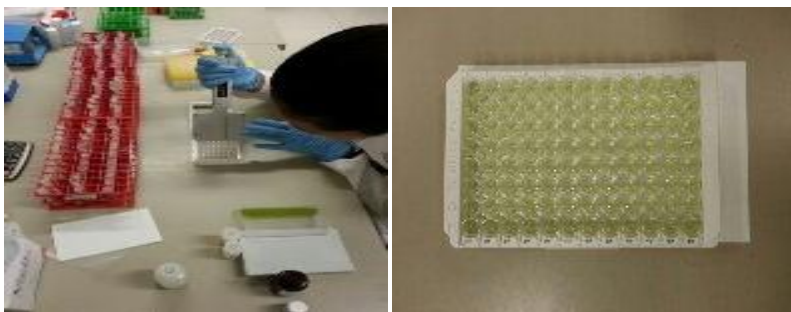
**Figura 7.2.** Placas con los pocillos en contacto con la muestra.

3. Se lavó la placa con ayuda de un lavador automático Tecan; como este es un paso crítico se aseguró que el pH de la solución de lavado (Tris NaCl Buffer 20x) fuera el correcto (pH 7.0) y asegurando también de que los lavados se hicieran correctamente, no dejando solución de lavado en los pocillos.



**Figura 7.3.** Lavador Tecan.

4. Posteriormente se añadió el conjugado enzimático 1 (conjugado Sheep anti-p24, 0.005% Sulfato de Gentamicina) a cada pocillo y se sometió después a una incubación. Este paso permitió a los anticuerpos de carnero anti p24 presentes en el conjugado 1 se fijen a los antígenos- anticuerpos VIH-1 fijos en los pocillos.



**Figura 7.4.** Dispensación del primer conjugado.

5. Segundo lavado.



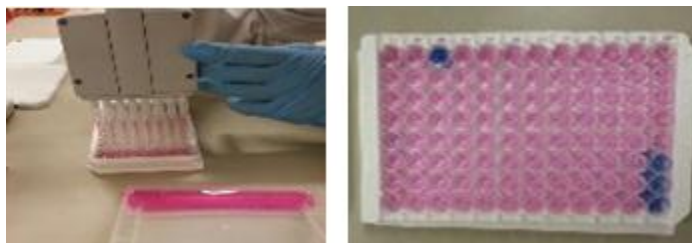
**Figura 7.5.** Lavador Tecan.

6. Se añadió el conjugado 2 (conjugado de Avidina, 0.005% Sulfato de Gentamicina) a cada pocillo y se somete a incubación. La avidina del conjugado 2 se liga de forma específica a los complejos antígeno-anticuerpo VIH-1 fijos a los pocillos. El excedente del conjugado se elimina mediante en siguiente lavado.



**Figura 7.6.** Dispensación del segundo conjugado y el segundo lavado.

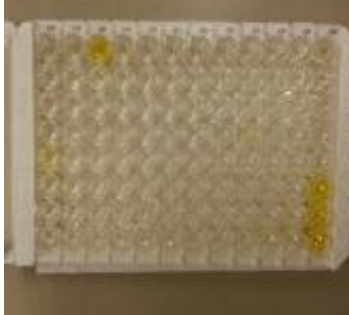
7. Se añadió la solución de trabajo TMB (Tetrametil bencidina) y se procedió después a incubación. Se observó una coloración azul o verde azulada, directamente proporcional a la cantidad de antígeno VIH-1 presente en la muestra.



**Figura 7.7.** Dispensación del sustrato.



8. Se detuvo la reacción colorimétrica añadiendo la solución Stop (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), que detiene a la enzima ocurriendo una reacción colorimétrica que se pone en evidencia con el cambio de coloración, de azul verdoso a amarillo.



**Figura 7.8.** Dispensación del Stop.

9. La densidad óptica (OD) de las muestras y de los controles se determina por espectrofotometría a una longitud de onda de 450/620 – 700 nm.<sup>34</sup>

### 7.7.1 Validación e interpretación de los resultados

Un test es válido si se cumplen los criterios establecidos por el fabricante o en el inserto los cuales son:

- Los valores de absorbancia individuales de los controles negativos deben ser superiores a  $0.00 \leq 0.1$  UA.
- Las absorbancias medias de los controles positivos deben ser  $\geq 0.5$  UA.

Cálculo del valor umbral (UA).

Se obtiene sumando un factor constante (0.07) al valor de absorbancia media de los controles negativos. (UA= 0.07 + D.O del Control Negativo)

Interpretación de resultados.

La presencia o la ausencia del antígeno p24 VIH-1 que se determina comparando para cada muestra la absorbancia registrada con la del valor umbral calculado. Las muestras cuyos valores de absorbancia sean  $0.00 \leq 0.1$  UA no reactiva y las  $\geq 0.5$  UA son consideradas como reactivas.<sup>34</sup>

## 7.8 Aspectos de control de calidad

La fiabilidad de los resultados depende del seguimiento correcto de las siguientes Buenas Prácticas de Laboratorio<sup>35</sup>:

- No usar el reactivo caduco.
- No mezclar reactivos de distintos lotes dentro de una misma validación.
- Antes de usar los reactivos es necesario esperar 30 minutos para que se estabilicen a temperatura ambiente.
- Reconstituir los reactivos evitando contaminación.
- Usar material nuevo y desechable.
- Usar las puntas de dispensación para cada muestra.
- Comprobar la exactitud y precisión de las pipetas y verificar que el instrumento este trabajando correctamente.
- No cambiar el procedimiento.
- Utilizar los sueros control en paralelo de las muestras.
- No manipular con las manos desnudas, el uso de guantes es obligatorio.
- No pipetear con la boca.
- Evitar derramar las muestras y los controles
- Usar los reactivos de forma correcta ya que algunos contienen azida sódica, azida de cobre o plomo, como por ejemplo el diluyente para las muestras y este reactivo es muy tóxico.

## 7.9 Análisis estadístico

Se obtuvieron los porcentajes de resultados positivos y negativos por cada método y se compararon con la prueba  $\chi^2$ . Se calculó la sensibilidad, especificidad e índice de falsos positivos y negativos para la prueba de escrutinio, con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS V 20.0.

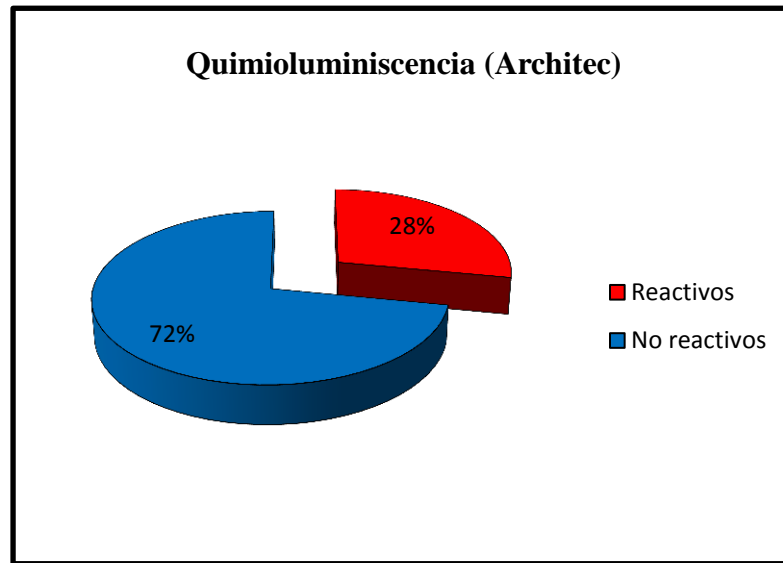
## VIII. RESULTADOS.

Se analizaron 141 muestras de pacientes con probable infección por VIH a los cuales se les realizaron tres pruebas diferentes:

- 1) Prueba de escrutinio a través de quimioluminiscencia.
- 2) Prueba confirmatoria por Western blot.
- 3) Determinación del antígeno p 24 por el método de ELISA.

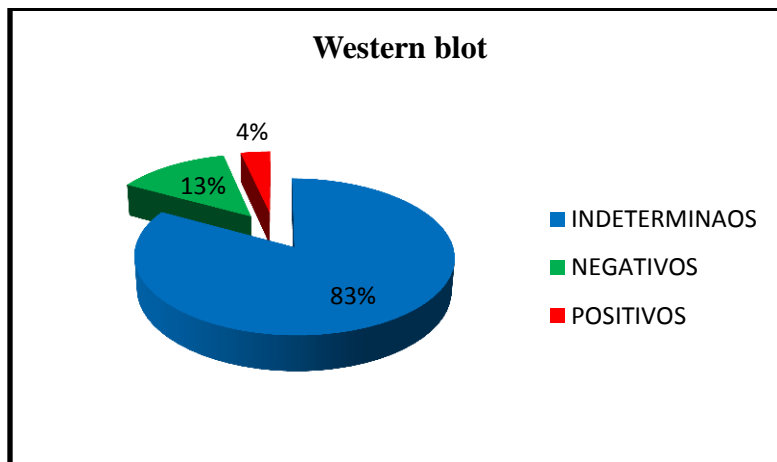
Se encontraron 5 pacientes con resultados positivos en las tres pruebas, las cuales se utilizaron como controles positivos junto con los controles propios de cada prueba.

En los resultados para la prueba de escrutinio Architect para el diagnóstico de VIH se obtuvo un 28% de muestras reactivas como se muestra en la figura 18.



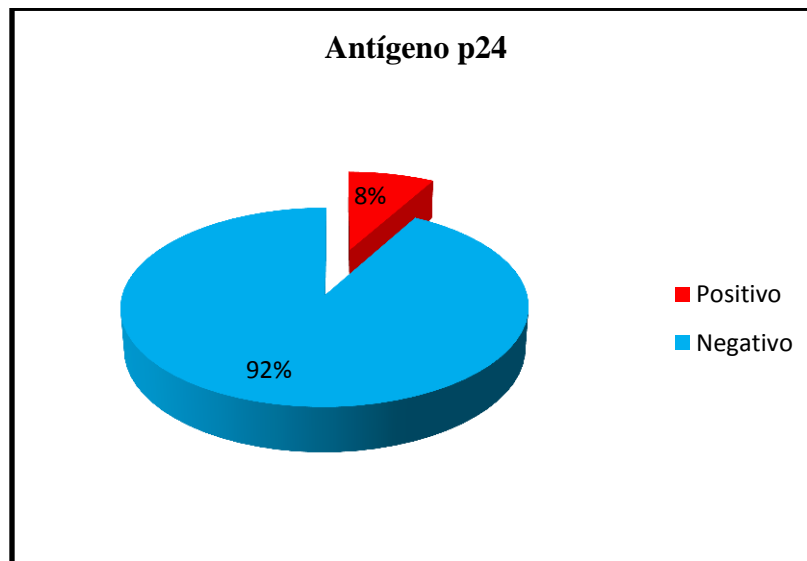
**Figura 8.1.** Porcentaje de muestras no reactivas y reactivas procesadas por el equipo Architect

Se observa en la figura 19 la distribución de los resultados de las muestras analizadas por Western blot.



**Figura 8.2.** Resultados del Western blot.

Al analizar los resultados anteriores se determinó que 136 muestras eran discordantes entre la prueba de escrutinio (Architec) y el Western blot; por lo que a estas muestras se les realizó la determinación del antígeno p24 por el método de ELISA, encontrando que 11 (8%) muestras fueron positivas al antígeno p24 figura 20.



**Figura 8.3.** Resultados de la determinación del antígeno p24 por el método de ELISA.

Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos por el método de quimioluminiscencia (Architec) y la determinación del antígeno p24 por ELISA y los resultados se muestran en el cuadro 10.

**Cuadro 8.1.** Quimioluminiscencia vs Antígeno p24

Antígeno p24			
Quimioluminiscencia	Negativo	Positivo	Total
Reactivo	76%	24%*	28%
No reactivo	97%	3%	72%
Total	92%	8%	100%

\*Prueba  $\chi^2$ ,  $p < 0.0001$ .

Con los datos anteriores se calculó la confiabilidad diagnóstica para la prueba de escrutinio (Architec), con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Observándose así en el cuadro 11.

**Cuadro 8.2.** Sensibilidad y especificidad de la prueba de escrutinio Architec respecto a la determinación del antígeno p24.

Prueba diagnóstica Architec	Resultado	IC95%
Sensibilidad	72%	63-81%
Especificidad	79%	71-87%
VPP	24%	9-39%
VPN	97%	94-100%

## IX. DISCUSIÓN

En la actualidad hay más de 39.5 millones de personas en el mundo que viven con VIH o SIDA y cerca de un millón y medio son menores de edad, a falta de una solución para combatir este virus existe la prevención y, por supuesto, la detección temprana del virus siendo indispensable para garantizar la calidad de vida, evitando así la propagación de la infección.

El SIDA es la pandemia más importante de nuestro siglo por su crecimiento exponencial, las consecuencias familiares, sociales o laborales, y su desenlace mortal en todos los casos; constituyendo así una amenaza para los programas internacionales de seguridad (Seguridad Transfusional en México), por lo que la política de algunos países en este sentido está encaminada a la detección de la infección en etapas tempranas; cabe mencionar que desde el año 2003 es la Comisión Federal para la Protección contra los Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) la encargada de realizar la vigilancia sanitaria.<sup>36</sup>

La infección por el VIH tiene un perfil serológico característico que permite detectar dos etapas de antigemia: una al inicio de la infección y antes de la seroconversión, a la que se le ha llamado “periodo de ventana” y otra que aparece cuando se establece el compromiso inmunológico y la evolución a SIDA.

Hasta la fecha, el diagnóstico se realiza mediante pesquisaje serológico de anticuerpos y mediante ensayos complementarios y la confirmación con el Western blot. A pesar de que ha aumentado notablemente la sensibilidad de los ensayos basados en anticuerpos. Por este motivo, cada día cobra mayor importancia la introducción de ensayos para la detección del antígeno p24.

Expertos de la *Food and Drug Administration* (FDA) determinaron que aunque las pruebas genéticas serán capaces de detectar el VIH antes de la seroconversión, no era factible su utilización en el pesquisaje masivo por lo costoso de las pruebas. Como alternativa, se valoró la prueba de detección de antígeno p24 para reducir el riesgo de transmisión del VIH.<sup>37,38</sup>

Desafortunadamente no se ha logrado que todas las personas que viven con el VIH o SIDA se detecten a tiempo, lo que limita que reciban el tratamiento antirretroviral a tiempo para mejorar la calidad de vida; por ello se insiste en hacer conciencia en que se realice la prueba como medida de prevención así como lo establece la NOM-010-SSA2-1993.<sup>39,40</sup>

Más del 50% de las personas se detectan en etapas tardías o a menos de un año de desarrollar la sintomatología, debido entre otros factores a que las personas no regresan por sus resultados, por la ubicación de centros de la salud que puedan asesorar donde, cómo y cuándo realizarse el estudio o por estigma a la discriminación, lo que ocasiona pérdida de oportunidades diagnósticas. Por lo que cabe mencionar que es de suma importancia que las personas sean responsables y conozcan su condición al VIH especialmente si ha tenido prácticas de riesgo.<sup>41</sup>

En este sentido, la relación cronológica del diagnóstico del VIH en un hospital de referencia tuvo un 51% de 474 pacientes llegando en la primera consulta con un estadio avanzado, con un deterioro importante de inmunidad celular; haciendo un hallazgo importante y mencionando la imperiosa necesidad de mejorar un programa de detección de personas infectadas por VIH a fin de no perder el tiempo, que es indispensable para el tratamiento de la infección.<sup>42</sup>

En este estudio se recolectaron muestras del periodo del mes de agosto del 2012 al mes de febrero del 2013 donde se analizaron 141 muestras de pacientes con probable infección por VIH, con resultados no concordantes entre la prueba de escrutinio y la prueba confirmatoria Western blot, a las cuales se les realizó la prueba del antígeno p24 por el método de ELISA y determinó la sensibilidad de la prueba de escrutinio por el método de quimioluminiscencia (Architec). Observamos que en la prueba de escrutinio Architec existe un 28% de muestras reactivas y un 72% de muestras no reactivas; esto inicialmente nos indica que hay un mayor número de pacientes sin el virus, cabe mencionar que sólo ésta es la parte presuntiva y no se sabe en qué etapa se encuentra el paciente con probable infección por el VIH.

A las muestras anteriores se les realizó la prueba confirmatoria por Western blot dando como resultados un 83% de muestras indeterminadas, 13% de muestras negativas y un 4% de muestras positivas; observándose así que el 72% de muestras no reactivas no son de pacientes sin el virus como en un principio se mencionó, pues en un mayor porcentaje se encuentran resultados de pacientes con un resultado indeterminado. Un resultado de Western blot indeterminado puede ser causado por un título débil de anticuerpos anti VIH-1 (como se observa en la seroconversión temprana), SIDA avanzado, una infección con un tipo inusual de VIH como es el tipo 2, o receptores de vacunas experimentales de VIH. También puede ser causada por la presencia de anticuerpos de reacción cruzada contra antígenos de VIH (infección viral accidental, vacunación contra la influenza, hepatitis o rabia; u otro tipo de infección), o reactividad a componentes no virales (algún desorden de autoinmunidad, mujeres embarazadas o con embarazos múltiples y receptores de múltiples transfusiones de sangre).<sup>42,43,44</sup>

El Western blot es usado de manera rutinaria para confirmar un resultado de una prueba de escrutinio serológico reactivo de VIH. Estos ensayos contienen proteínas del VIH recombinantes, permitiendo la determinación de la especificación antigénica de los anticuerpos en el suero del paciente;<sup>45</sup> sin embargo, es importante recordar que no debe realizarse un Western blot sin haber practicado una previa prueba de escrutinio pues tienen diferentes alcances y puede mal interpretarse un resultado negativo cuando no lo es.

A un Western blot indeterminado debe dársele seguimiento con una repetición de inmunoensayo y análisis del Western blot realizándolo en un periodo de 1-3 meses, con carga viral para el diagnóstico de VIH; la reactividad persistente de los ensayos para detectar anticuerpos en la prueba de escrutinio con una falta simultánea de cualquiera de las bandas presentes en esta determinación o cambios de patrones del mismo pueden sugerir la ausencia de la infección por VIH, sin embargo debe dársele seguimiento como lo indica la OMS.<sup>45,46,47</sup>

Con los datos obtenidos de la prueba de escrutinio (Architec) y la prueba confirmatoria Western blot se prosiguió a la determinación del antígeno p24 observándose en la determinación del antígeno p24 que hay un 8% de muestras positivas y un 92% de muestras negativas.

En este sentido, la determinación del antígeno p24 se relaciona o coincide con la prueba de escrutinio presentando un 72% de muestras no reactivas y un 28% de muestras reactivas, lo cual nos está indicando que el reactivo Architec combo Ag-Ac VIH si es útil para el diagnóstico del VIH debido a que contiene la determinación del antígeno p24 en su reactivo utilizado, o bien es una buena alternativa para el seguimiento evolutivo de los pacientes infectados por el VIH; aunque cabe mencionar que esta prueba aun no es efectiva para dar un diagnóstico definitivo de infección por VIH como lo es la prueba confirmatoria por Western blot aunque sean de cuarta generación.

Respecto a la relación que existe entre la prueba de escrutinio y la determinación del antígeno p24 se refleja que existe un 97% de muestras no reactivas con un resultado para el antígeno p24 negativo, un 24% en la prueba de escrutinio pacientes con resultados reactivos con un resultado del antígeno p24 positivo; y entre las muestras que no concuerdan existe un 3% de muestras con resultados para la prueba de escrutinio no reactivos con el antígeno p24 positivo y un 76% en la prueba de escrutinio reactiva con un antígeno p 24 negativo.

Se identificaron casos en los que no concordaron los resultados entre las pruebas realizadas y tuvimos la oportunidad de darles seguimiento empleando otro tipo de pruebas como la carga viral. En un caso en particular se encontró que en la prueba de escrutinio (Architec) dio un resultado reactivo, muy alto al valor de corte; para el Western blot dio un resultado negativo, para la determinación del antígeno p24 positivo y en carga viral >10 000 copias/mL; lo cual es claro de una seroconversión. Este caso se documentó y se dio seguimiento con otras muestras del paciente referidas al laboratorio Carpermor en fechas posteriores a este proyecto.

Recordemos que el protocolo para un diagnóstico para la infección por el VIH establece la detección de anticuerpos específicos contra el virus por medio de una prueba de ELISA y la confirmación de resultados reactivos con la técnica de Western blot; sin embargo, es común enfrentarse al problema de individuos que presentan un resultado reactivo en el tamizaje, pero un patrón de bandas por Western blot indeterminado o negativo.<sup>48,49,50,51</sup>

Este tipo de hallazgos pueden ser explicados de varias maneras: los pacientes podrían encontrarse en un estado temprano de la infección previo a la seroconversión, no estar infectados realmente, o presentar algunas sustancias (vacunas o bien pacientes con tratamiento antirretroviral) en el suero que interfiera con el resultado de la prueba. Otras posibles explicaciones podrían ser la respuesta incompleta (poca producción de anticuerpos) contra el VIH-2, las reacciones cruzadas de anticuerpos contra otros retrovirus o la presencia de auto-anticuerpos<sup>47</sup>, como se mencionó anteriormente.



En el presente trabajo se observó un gran número de resultados por Western blot indeterminados, de estas personas algunas de ellas pueden estar infectadas por el VIH-1 y desarrollar un resultado positivo para el virus al cabo de un mes o más tiempo, sin embargo algunos individuos con enfermedad avanzada pueden permanecer indeterminados o bien negativos por el deterioro inmunológico avanzado disminuyendo la respuesta y producción de anticuerpos contra diferentes antígenos del VIH. Un pequeño número de personas que presentan un resultado de Western blot indeterminado repetidamente es poco probable que estén infectados por el VIH. También debemos considerar a los pacientes con resultados falsos negativos por causas como el efecto prozona cuando se tiene la enfermedad avanzada, teniendo causas como los defectos de las pruebas diagnósticas (vencimientos de lote, degradación del reactivo, mala conservación y/o defectos de fábrica). Por ello, también cabe mencionar que es muy importante que el personal que realice estas determinaciones esté capacitado y conozca de todos los factores que pueden interferir con el resultado; así como también que el médico realice una buena historia clínica y proporcione la mayor cantidad de información al laboratorio.<sup>52,53,54</sup>

Existió otro caso en donde se observó un paciente con un resultado en la prueba de escrutinio (Architec) negativo, un resultado para Western blot indeterminado, una determinación del antígeno p24 positivo y carga viral de 0 copias/mL; probable falso positivo, del cual podemos decir que en estos casos se podría deber a alguna reacción por vacuna reciente (vacunas contra la hepatitis B, vacunas contra la rabia o la vacuna de la influenza), infecciones virales incidentales, enfermedad autoinmune, falla renal, fibrosis quística, embarazos múltiples, varias transfusiones de sangre, enfermedad hepática, abuso de sustancias parentales, etc..<sup>54,55,56</sup>

Respecto al porcentaje de la determinación del antígeno p24 no se logró observar como tal la presencia del antígeno para la mayoría de las muestras procesadas, la presencia o ausencia de antigenemia se ha visto relacionada con las distintas fases evolutivas de la enfermedad y como este estudio solo fue transversal, solamente se contaba con una muestra de suero tomada una única vez, por lo que no se le pudo dar seguimiento a estos pacientes para saber su situación con respecto al diagnóstico para el VIH.<sup>57</sup>

Es importante resaltar que el tener presente algunos casos de pacientes con resultados falsos positivos, falsos negativos, resultados con Western blot indeterminados o detecciones de antígenos p24 positivos o negativos, nos permiten realizar una aproximación más precisa al diagnóstico, darle seguimiento con otras pruebas adicionales (cargas virales, PCR, cultivo del virus, conteo de linfocitos CD4+, etc.), ir evitando que un paciente infectado continúe sin la atención oportuna que impida el progreso de su enfermedad y sobre todo el contagio a otras personas. Cabe mencionar que el diagnóstico de la infección por el VIH es el resultado de la integración de tres criterios básicos: el clínico, el epidemiológico y el del laboratorio.<sup>58,59</sup>

Por último con todos los datos recopilados del estudio y con la determinación del antígeno p24 se obtuvo un 72% de sensibilidad y un 79% de especificidad para la prueba de escrutinio por quimioluminiscencia Architect que utiliza como reactivo el combo Ac-Ag p24 de cuarta generación observándose una buena relación con los resultados de ELISA Ag p24. Si tomamos en cuenta que para ser considerada una prueba diagnóstica como aceptable se debe tener una sensibilidad y especificidad superior al 80%,<sup>29</sup> y los resultados están cercanos a este dato, podemos decir que el uso de pruebas como el método de ELISA pudieran resultar una alternativa útil en el seguimiento clínico y serológico de individuos infectados por VIH, permitiéndonos monitorear el estado de salud del paciente, ayuda a resolver las discrepancias de resultados para así tener un diagnóstico más certero de la infección, ya que detecta Ag-Ac para el VIH 1-2, sirve para identificar la ausencia de la enfermedad, pero sin ser una prueba definitiva para el diagnóstico de VIH como lo es una confirmatoria como el Western blot, ya que podemos caer en un error de reportar un resultado falso.

## **X. CONCLUSIÓN**

Se encontró un 8% de muestras positivas al antígeno p24 cuando las determinaciones por la prueba de escrutinio (Architec) y el Western blot eran discordantes.

Se observó una concordancia de resultados negativos del 97% y positivos del 24% entre los métodos de quimioluminiscencia y detección de antígeno p24.

Se obtuvo un 72% de sensibilidad y un 79% de especificidad en la prueba de escrutinio por quimioluminiscencia (Architec) a través de la determinación del antígeno p24.

La prueba de quimioluminiscencia (Architec) es una prueba útil para el diagnóstico, seguimiento clínico y serológico de individuos infectados por el VIH; así como un apoyo para el diagnóstico temprano de la infección debido a que el reactivo empleado cuenta con la posibilidad de detectar el antígeno p24 aún en el periodo de ventana.

## **XI. PROPUESTAS**

Este estudio sirve como incentivo para que los laboratorios de diagnóstico de la salud lleven a un estudio sobre el VIH más exhaustivo aun siendo sólo una prueba de escrutinio, para identificar la correcta presencia de la infección y hacer hincapié al médico de las posibles causas del resultado o bien enviar notas o sugerencias para el paciente en cuanto a sus pruebas de diagnóstico.

Cabe mencionar la importancia y hacer conciencia al personal médico de que las tres pruebas tienen alcances diferentes y hay que darle seguimiento a cada una y no quedarnos con un solo resultado.

Por lo tanto se sugiere la realización de un cuestionario previo (Anexo 1), así como adicionar notas (Anexo 2) al liberar los resultados en caso de sospechar de una infección reciente por el VIH, esto con el fin de detectar oportunamente la infección.

Para la empresa Carpermor en particular se realizó un protocolo (Anexo 3) a seguir para el apoyo al diagnóstico del VIH.

## ANEXO 1. Cuestionario para apoyo al diagnóstico del VIH.

### Preguntas

(Razón, con qué frecuencia, número y tipo)

#### *Hombres/Mujeres*

¿Ha perdido peso en los últimos 6 meses sin causa aparente?

¿Se ha realizado anteriormente alguna prueba para el diagnóstico de VIH y cuál ha sido su resultado?

¿Sabe si padece alguna enfermedad autoinmune?

#### *Prácticas sexuales*

¿Número de parejas sexuales que ha tenido?

Ha practicado relaciones sexuales de alto riesgo ¿en qué tiempo?

¿Utiliza algún método de protección durante sus relaciones sexuales?

¿Ha sufrido abuso sexual?

¿Ha utilizado drogas intravenosas?

#### *Prácticas quirúrgicas*

¿Ha sufrido de alguna operación o trasplante?

¿Lo han transfundido?

¿Ha donado sangre?

¿Se ha vacunado recientemente y cuál ha sido?

#### *Mujeres*

¿Ha estado embarazada?

¿Número de embarazos?

## ANEXO 2. NOTAS SUGERIDAS

Con el resultado obtenido del Western blot y prueba de escrutinio se puede adicionar algunas notas en apoyo al diagnóstico del paciente, dependiendo del resultado sugiriendo lo siguiente:

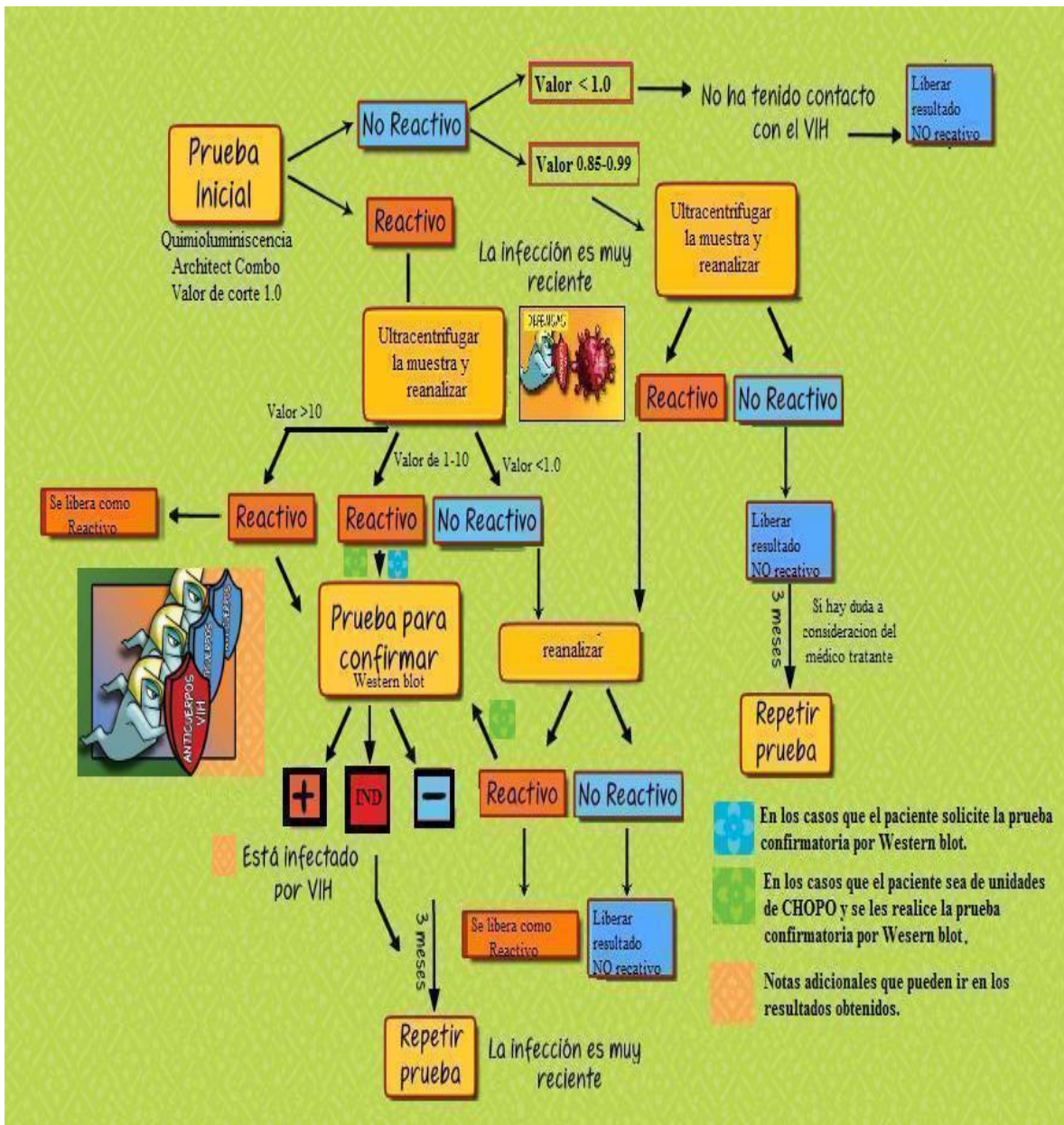
- La determinación de VIH 1-2 por el método de quimioluminiscencia que es una prueba de escrutinio; todo resultado reactivo debe confirmarse por medio del método de Western blot, que es la prueba confirmatoria.
- Si la prueba de escrutinio es reactiva y el Western blot es negativo: si el virus está presente, es posible que aún no se hayan producido los suficientes anticuerpos que permitan su detección por el Western blot, por lo que se recomienda repetir el estudio de uno a tres meses; a consideración médica.
- Cabe señalar que en la prueba de escrutinio puede dar falsos positivos por reacciones cruzadas con otras infecciones virales o bacterianas, sugiriendo así la repetición del estudio en días posteriores.
- Los resultados indeterminados pueden deberse a la seroconversión, a reacciones cruzadas por ello se recomienda repetir el estudio y dar seguimiento a su resultado.
- Los resultados indeterminados pueden deberse a una infección por VIH-2 o por reacciones cruzadas por retrovirus se sugiere dar seguimiento a su resultado.
- Si se observan bandas no estructurales es recomendable ponerlas en los resultados, de alguna manera dar seguimiento a ese diagnóstico.
- Se recomienda repetir el estudio en un lapso de uno a tres meses, a consideración del médico tratante.
- Si la prueba de escrutinio es reactiva y muy cercana al punto de corte, se recomienda repetir el estudio en 1 o 3 meses a criterio médico; en este caso recomienda liberar el resultado poniendo el resultado numérico de S/CO y la respectiva tabla de interpretación y no la palabra Reactivo o No Reactivo.

Con alguna de estas notas podemos ayudar a que el médico considere si es o no necesario repetir el estudio y darle un diagnóstico al paciente más certero, confiable y seguro. Estas notas ayudan también mucho al paciente para que no caiga en el mal diagnóstico de que este no es positivo en primera instancia por que puede ser una reacción cruzada o bien para que se repita el estudio y si es verdaderamente positivo tal vez la razón se por qué aún no había producido los suficientes anticuerpos para detectarlos en aquel entonces y de esa forma prevenir las acciones e iniciar un tratamiento adecuado.

### ANEXO 3 Protocolo para el Laboratorio Carpermor

#### Protocolo para la detección temprana del VIH.

- Al ser ingresada la muestra a control de muestras, esta deberá ir acompañada con su cuestionario para apoyo a su diagnóstico en los casos que se requiera.
- Una vez que la muestra este en el departamento de proceso se llevará a cabo el siguiente protocolo:



### **XIII. REFERENCIAS**

1. Lamotte JA. Infección-enfermedad por VIH/SIDA. En: Roca Goderich R, Smith Smith VV, Paz.Presilla E, Losada Gómez J, Serret. Rodríguez B, Llamos Sierra N, et al. Temas de medicina interna. 4 ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2002.p. 579-95.
2. Filkelman J. Discurso del presente Grupo Temático de ONUSIDA. Zacatecas, México; 2006: 1-40.
3. Pinzon E. Prevalencia y factores relacionados con la presencia del VIH-SIDA. Colombia Médica. 2008: 56-92.
4. Vigilancia epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México. Registro Nacional de casos de SIDA. Actualización al 30 de septiembre del 2012 (CENSIDA). Disponible en: [http://lasjuventudesproponen.org/wpcontent/uploads/user\\_uploads/admin/casos\\_acumulados\\_septiembre2012.pdf](http://lasjuventudesproponen.org/wpcontent/uploads/user_uploads/admin/casos_acumulados_septiembre2012.pdf)
5. Kahan JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. New Engl J Med. 1998; 339(1):33-9.
6. Selwyn PA, Arnold R. From fate to tragedy: The changing meanings of life, death, and aids. Ann Intern Med. 1998; 129(11):899-902.
7. Guillén M. Infección por el VIH, epidemiología, etiopatogenia e historia natural. Infección por el VIH. Barcelona: Emisa, 1996. p. 9-28.
8. Organización Panamericana de la Salud. Pautas para la atención clínica de la persona adulta infectada por el VIH. Washington: DC: OPS, 1999. p. 18-22.
9. Emerman M, Malim MH. HIV regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. Madrid: Science, 1998. p. 1880-4.
10. Pascual-Hernández A, Corral-Arias JL. El virus de la inmunodeficiencia humana. Inmunopatogenia. 2000: 30-6.
11. Streicher, HZ, Reitz MS Jr, Gallo RC. Human immunodeficiency viruses. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone; 2000. p. 1874-87.
12. Cordero N, Taraco R. Temas de bacteriología y virología médica. México: Panamericana; 1997. p. 449-76.
13. Murray P, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal K. Retrovirus en microbiología médica, 2ª ed; Buenos Aires: Harcourt; 1997.



14. Sigifredo Ospina O. Diagnostic of human immunodeficiency virus. *Asociación Colombiana de Infectología*. 2006; 10 (4):273-8.
15. Galván-Barahona JL. Pruebas de tamizaje. *Red de Comunicación e Integración Biomédica (Red CIB)*. 2009:1-6
16. White EF, Garfein RS, Brouwer KC, Lozada R, Ramos R, Fiestone-Cruz M, et al, Prevalence of hepatitis C virus and HIV infection among injection drug users in two Mexican cities bordering the U.S. *Salud Pública Mex*. 2007; 49: 165-72.
17. Gatell JM, Buira E, Soriano A, Totajada C, Soriano E, et al. Historia natural, clasificación y pronóstico de la infección por el VIH-1. En: *Guía práctica del SIDA. Clínica diagnóstica y tratamiento*. 5 ed. Madrid: Masson; 1998. p. 50-73.
18. Fauci AS, Clifford L. Human immunodeficiency virus (HIV) disease: AIDS and related disorders. En: Braunwald E, Fauci AS, Kasper D, L, Hauser SL, Longo D, L, Jameson JL. Harrison. *Principles of internal medicine*. 15 ed. New York: McGraw-Hill, 2001; t2. p. 1852-913.
19. Rubio-Caballero M, Rubio-Rivas C, Nogues-Biau A. Supervivencia y progresión de la enfermedad en 251 pacientes con infección por el VIH-1. Estudio del antígeno p24 y carga viral como marcadores pronóstico. *AnMed Inter*. 2001; 18(10): 517-21.
20. Díaz-Torres H. Antigenemia p24: correlación con algunos aspectos clínicos y epidemiológicos en 100 individuos cubanos infectados por VIH-1. *Rev Cubana Med. Trop*. 2001; 53(3):137-44.
21. Pérez J, Pérez D, González I, Díaz J, Millán JC, Orta M. Pautas cubanas para el tratamiento antirretroviral en los pacientes con VIH/SIDA. La Habana: Ministerio de Salud Pública, 2004. p. 2-13.
22. Bartlett JG, Gallart JE. 2000-2001. *Medical management of HIV infection*. New York: Glaxowellcome; 2000. p. 99-154.
23. Wilson JMG, Junger G. *The principles and practice of screening for disease*. Public Health Papers: WHO No. 34;1968.
24. Mandell GL, Douglas R, Bennett JE. *Enfermedades infecciosas, principios y practicas*; 6a ed. Madrid; Elsevier. 2005. p. 1506-27.
25. Newmark P. AIDS in African context. *Nature* 1986; 324(6098): 611.
26. Centers for Diseases Control and Prevention. Revised Guidelines for HIV Counseling, Testing, and Referral. *MMWR* 2001; 50 (RR-19): 1-106.
27. De Simone JA, Pomerantz RJ. New methods for the detection of HIV. *ClinLabMed*. 2002; 22:573-92.

28. Clavel F, Brun V, Guetard D, et al. LAV II, unsecond retrovirus associate SIDA. *Quest Acad. Paris.* 1986; 13: 485-8.
29. Sánchez-Rodríguez MA, Rosas-Barrientos JV. Confiabilidad de las pruebas diagnósticas. En: Mendoza-Núñez VM, Sánchez-Rodríguez MA, Correa-Muñoz E [Eds]. *Estrategias para el control de enfermedades crónico-degenerativas a nivel comunitario.* México: UNAM.2008. p. 175-191.
30. Centers for Diseases Control. US Public Health Service guidelines for testing and counseling blood donors and plasma donors for HIV type 1. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1996; 45: 3-8.
31. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana.NOM-010-SSA2-1993. Para la prevención y control del SIDA. 21 junio 2000.
32. World Health Organization. AIDS. Proposed WHO criteria for interpreting results from western blot assays for HIV-1 and HTLV-1/HTLV-II. *Wkly Epidem Rec* 1990; 65:281-3.
33. Centers for Diseases Control. Interpretation and use of the western-blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1989; 38:1-7.
34. Schaeffler B, Flesher A, Shriver K, Tam MR. Monoclonal antibody detection of p24/25 HIV antigen in the serum and CSF of patients within the AIDS spectrum. Abstract 7759, IV International Conference on AIDS, 1988.
35. Normas de bioseguridad para laboratorios de diagnóstico e investigación que trabajan con el VIH. Serie OMS sobre el Sida, 9. Ginebra: Organización Mundial de la Salud;1992. p. 7-13.
36. Courouce AM, Barin F, Maniez M, Janot C, Noel L, Elghouzzi M.H. Effectiveness of assays for antibodies to HIV and p24 antigen to detect very recent HIV infections in blood donors. *AIDS.* 1992; 6(12): 1548-50.
37. Ortho Diagnostic Systems Inc. and Chiron Corporation. FDA Licenses First HIV Antigen Assay for Blood Screening. *Transfusion Diagnostics Update.* March 1996: 1 and 8.
38. Izquierdo M, Silva E, Díaz H. Estudio comparativo de dos sistemas de captura de la proteína de 24 kd del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. *Biotecnología Aplicada* 2000; 17: 102-4.
39. Allen M, Lau CY. Social impact of preventive HIV vaccine clinical trial participation: a model of prevention, assessment and intervention. *SocSci Med.* 2008; 66:945-51.

40. Branson BM, Handsfield HH, Lampe MA, Janssen RS, Taylor AW, Lyss SB, revised recommendations for HIV testing of adults, adolescents, and pregnant women in health-care setting. *MMWR Recomm Rep* 2006; 55 (RR-14): 1-17.
41. Huertos-Valencia YQ. Protocolo para la elaboración del diagnóstico y plan de tratamiento estomatológico del paciente con VIH-SIDA. México D.F. 2010.p. 73.
42. Taboada A, Insfrán I, Vicenti C, Benítez G, Kunzle C. Enfermedades marcadoras más frecuentes y su relación cronológica con el diagnóstico de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana en un hospital de referencia. *Rev Inst Med Trop.* 2008; 3(1):15-20
43. López-Bernaldo de Quiroz JC, Delgado R, García F, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH. Unidad de enfermedades infecciosas-VIH. Hospital General Universitario. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.*2007;25(10): 632-8.
44. Lupo S. Clínica y terapéutica de la Infección por el VIH y SIDA.Tomo 1.UNR; 2003.
45. Mahajan VS, Pace CA, Jarolim P. Interpretation of **HIV** serologic testing results. *Clin Chem.* 2010; 56: 1523-1527.
46. Hoyos-Orrego A, Gomez-Bulies C, Vanegas-Arroyave N. Falso negativo en la prueba de Western blot en un paciente con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Asociación Colombiana de Infectología; Publicación Vol. 7-3, 2003; p. 173-176.*
47. Báez M. Enfermedades de VIH-SIDA. Paraguay: Editorial. 2005. p. 15-20.
48. Gatell JM, Clotet B, Podzamczar D. Guía práctica del SIDA. Clínica, diagnóstico y tratamiento.5a ed. Barcelona: Masson; 2000: 89-110.
49. Bartlett J, Gallant J. Medical management of HIV infection: Baltimore, Maryland. The Johns Hopkins University, División of Infectious Diseases; Chapter 2000-2001; 2:2-32.
50. Centers for Diseases Control and Prevention. Guidelines for laboratory test result reporting of human immunodeficiency virus type 1.Ribonucleic acid determination. Recommendations from a CDC Working Group. *MMWR* 2001; 50 (RR-20): 1-16.
51. Hammer S. Management of newly diagnostic HIV infection. *N Engl J Med.*2005; 353:1702-10.
52. Parera M, Ibañez A, Clotet B, Martinez M. Lack of evidence for protease evolution in HIV-1 infected patients after 2 years of successful highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2004; 189: 1444-51.

53. Nettles RE, Kieffer TL, Kwon P, et al. Intermittent HIV-1 viremia (Blips) and drug resistance in patients receiving HAART. *JAMA*. 2005; 293:817-29.
54. Erickson CP, McNiff T, Klausner JD, Influenza vaccination and false positive HIV result. *N Engl J Med*. 2006; 354: 1422-3.
55. Zhang L, Chung C, Hu BS, et al. Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest* 2000; 106:839-45.
56. Simonsen L, Buffington J, Shapiro CN, Holman RC, Strine TW, Grossman BJ, et al. Multiple false reactions in viral antibody screening assay after influenza vaccination. *Am J Epidemiol*. 1995; 141: 1089-96.
57. Quit EK, Mogg R, Brown DD, Lally MA, Mehrotra DV, DiNubile MJ, Robertson MN. HIV seroconversion without infection after receipt of adenovirus–vectored HIV type 1 vaccine. *Clin Infect Dis*. 2008; 47: 1593-9.
58. Guan M. Frecuencia, causas y nuevos retos de resultados indeterminados en pruebas confirmatorias con Western blot para anticuerpos de VIH. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14: 649-59.
59. Allen M, Lau CY. Social impact of preventive HIV vaccine clinical trial participation: a model of prevention, assessment and intervention. *SocSci Med*. 2008; 66:945-51.