

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

EVALUACION DE ESTRATEGIAS DIAGNOSTICAS DE LA INFECCION POR  
EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)



PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

Guatemala, Noviembre de 1995

R.  
06  
† (9676)  
C.B

## JUNTA DIRECTIVA

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIO	LICDA. ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. ANA MARIA RODAS CARDONA
VOCAL V	BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA

DEDICO ESTA TESIS

A: MI PATRIA GUATEMALA

LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

MI PADRE           Dr. Carlos Castillo

MI ASESOR         Dr. Gerardo Arroyo

## AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A la Asociación Pro-bienestar de la Familia de Guatemala APROFAM y al Centro de Orientación Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades de Transmisión Sexual "CODETS"

A Comercial Selecta, S.A. por su amistad, apoyo y contribución al financiamiento de esta investigación, especialmente a Abraham Mazariegos y Martha Tangay de Mazariegos.

A Miles, S.A. de Guatemala por su colaboración y financiamiento del presente estudio, especialmente al Dr. Jesús R. Núñez.

A Química Hoechst de Guatemala, S.A. por su contribución al financiamiento de esta investigación, especialmente a la Licda. Jenny S. de Mory.

A Labtronic, LTDA. por su contribución al financiamiento de esta investigación, en especial a Ing. Iñaki Altuna e Ing. Fernando Barrios.

A Abbott Laboratorios, S.A. por su contribución al financiamiento de esta investigación, especialmente a la Licda. Claudia Contreras.

A Arquisa, S.A. por su contribución al financiamiento de esta investigación, especialmente a la Licda. María Laura Mejicanos.

Al personal Profesional y Técnico del Hospital Modular de Chiquimula, y a todas las personas que en una u otra forma me brindaron su colaboración para la realización de este trabajo, ya que sin su ayuda no hubiese salido adelante.

## INDICE

	<u>PAG</u>
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	3
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1 Historia .....	5
3.2 Los Retrovirus.....	6
3.3 Modo de transmisión.....	9
3.4 Manifestaciones clínicas.....	13
3.5 Categorías clínicas.....	15
3.6 Diagnóstico.....	17
3.7 Epidemiología.....	24
4. JUSTIFICACIONES.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
6. HIPOTESIS.....	29
7. MATERIALES Y METODOS.....	30
7.1 Universo de trabajo.....	30
7.2 Procedimiento.....	30
7.3 Diseño de la investigación.....	50
8. RESULTADOS.....	51
9. DISCUSION.....	59
10. CONCLUSIONES.....	64
11. RECOMENDACIONES.....	66
12. REFERENCIAS.....	67
13. ANEXOS.....	75

## 1. RESUMEN

El presente estudio se realizó con el fin de evaluar las estrategias diagnósticas de la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), basado en la combinación de pruebas de tamizaje disponibles en Guatemala y en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, comparando métodos de ELISA y Aglutinación de partículas de Gelatina (PA, Fujirebio), teniendo como referencia el método de Western Blot.

En la actualidad, la estrategia diagnóstica de uso más general emplea una prueba de tamizaje, seguida de una prueba confirmatoria de "Western Blot" (WB). Asimismo y dependiendo de estos criterios se evaluó la utilización de una combinación de pruebas de tamizaje que están basadas en principios o preparaciones antigénicas diferentes, con el propósito de evitar la utilización de la prueba de WB, que es sumamente cara y que en la mayoría de casos podría no representar en realidad ningún beneficio adicional a las estrategias recomendadas por la OMS; logrando la máxima exactitud, con el mínimo de costos.

Es importante mencionar que PA es un método muy simple que no necesita equipo o instrumentos adicionales para su interpretación como los ELISA y que en general la combinación de dos o tres de estos distintos métodos, representan un costo mucho menor que la utilización de un sólo método de tamizaje en combinación con el Western Blot.

Las muestras analizadas por PA y los ELISA presentaron casi el 100 por ciento de sensibilidad bajo las mismas

condiciones experimentales cuando fueron comparadas contra WB como método de referencia.

Las tres sensibilidades más altas, fueron las de los métodos de Aglutinación de Partículas de Gelatina (PA VIH-1), ELISA Enzygnost Anti-VIH 1/-VIH 2 y ELISA Genelavia Mixt, y los métodos restantes presentan una sensibilidad ligeramente inferior pero no significativa entre sí.

Las estrategias recomendadas son: Utilizar como primer prueba Aglutinación de Partículas de Gelatina, si esta da resultado positivo realizar una segunda prueba con cualquiera de los tres métodos de ELISA siguientes: Enzygnost Anti-VIH 1/-VIH 2, Genelavia Mixt ó Wellcozyme VIH-1, si las anteriores dan igual resultado positivo, recurrir a cualquiera de los métodos de ELISA siguientes como una tercer alternativa; Abbott VIH-1/VIH-2 EIA Recombinante de Tercera Generación, Retro-Tek VIH-1 y Recombigen VIH-1/VIH-2.

## 2. INTRODUCCION

En la actualidad hay disponibles una variedad de métodos diagnósticos que difieren en sensibilidad y especificidad, que son usados como pruebas de tamizaje o pruebas confirmatorias de la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Entre éstos se incluyen la demostración de anticuerpos contra el virus (ELISA, Western Blot, Inmunofluorescencia, Aglutinación), detección de antígenos virales, aislamiento del VIH, o detección de material genético en células infectadas (Reacción de Polimerasa en Cadena).

En la actualidad, la estrategia diagnóstica de uso más general emplea una prueba de tamizaje que generalmente es un Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), seguida de una prueba confirmatoria de "Western Blot" (WB). La Organización Mundial de la Salud (OMS), recomendó recientemente que para la elección y el uso de las pruebas basadas en la detección de anticuerpos contra el VIH, deberían tomarse en consideración tres criterios; como el objetivo de la prueba, la sensibilidad y especificidad de la(s) prueba(s) que se emple(n) y la prevalencia de la infección por VIH en la población en estudio; asimismo y dependiendo de estos criterios también se recomienda la utilización de una combinación de pruebas de tamizaje que estén basadas en principios o preparaciones antigénicas diferentes, con el propósito de evitar la utilización de la prueba de WB, que es una prueba sumamente cara y que en la mayoría de casos podría no representar en realidad ningún beneficio adicional a las estrategias recomendadas por la OMS. Por lo tanto,



la OMS recomienda que los países estudien la posibilidad de aplicar estrategias para detectar anticuerpos contra el VIH en las que se empleen la prueba ELISA y/o pruebas rápidas y sencillas, en vez de la combinación ELISA/WB. Las estrategias recomendadas por la Organización Mundial de la Salud, para lograr la máxima exactitud, con el mínimo de costos, son tres, siendo éstas:

- 1) Toda muestra se examinará primero con un ELISA o con una prueba rápida/sencilla y las positivas se vuelven a someter a la misma prueba.
- 2) Toda muestra se someterá a una primera prueba y las positivas se someten a una segunda prueba empleando un principio antigénico diferente.
- 3) Toda muestra se somete a una primera prueba y las positivas se someten a una segunda y tercer prueba utilizando un principio antigénico diferente.

La selección de una de las estrategias dependerá de los objetivos de las pruebas, es decir, si se desea su aplicación en bancos de sangre, vigilancia epidemiológica o diagnóstico y de la prevalencia de la infección en la población bajo estudio.

Este estudio evaluará las estrategias diagnósticas de la infección por el VIH basado en la combinación de pruebas de tamizaje disponibles en Guatemala y en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA B  
BIOLOGIA - 1991

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Historia

Importante antecedente lo constituye la creencia de que la aparición del VIH en humanos podría señalarse en fechas tan tempranas como al inicio de la década de los años '50. Afirmación basada en estudios de genealogía para virus (1).

Se cree también que fue en el año 1959 que surgió de la presencia del VIH en sangre humana en el centro de Africa. Fue entonces que se tomó una muestra de sangre humana a una persona africana, habiéndose almacenado también en ese año e investigado en 1980. Este resultado fue reportado positivo (1).

En los años siguientes, se apreció una verdadera explosión epidémica entre los "Grupos de riesgo" en los E.U.A., especialmente en sus centros urbanos mayores, donde se observó un crecimiento exponencial del número de casos reportados. Se apreció también la elevada mortalidad de los casos definidos como SIDA y comenzaron a aparecer reportes crecientes en la mayoría de los países del mundo (2).

En el año 1983, el grupo del Instituto Pasteur de París, dirigido por Luc Montagnier, descubrió como probable agente causal del SIDA un retrovirus al que denominaron virus asociado a linfadenopatias (LAV) por haberse aislado primeramente de un homosexual con esta patología.

Meses más tarde, el grupo de trabajo dirigido por Roberto Gallo, del National Cancer Institute de Bethesda, Maryland, E.U.A., identificó como agente etiológico a un retrovirus al que denominan Virus Linfotrópico de Células T-Humana tipo III (HTLV-III) (2).

En julio de 1986, el Comité Ejecutivo para la Taxonomía de los virus (ICTV), recomendó emplear el nombre de Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), para denominar al virus implicado en la etiología del SIDA, en vez de la denominación de HTLV-III ó LAV.

En 1986 se descubrieron otros retrovirus relacionados con el SIDA, pero estructuralmente diferentes al VIH.

a. El LAV-2, descubierto por el grupo de Luc Montagnier en Guinea Bissau, Cabo Verde y Senegal. Este virus es capaz de provocar la enfermedad, pero requiere para su detección un ELISA diferente.

b. El HTLV-IV descubierto en el Senegal por el grupo de Myron Essex de Harvard. que produce anticuerpos, pero, al parecer, no enfermedad. También se ha estudiado un virus de los monos verdes de Africa denominado SIV (2).

### 3.2 Los Retrovirus

Los retrovirus son virus de animales cuyos genomas de ARN son replicados por medio de un ADN intermedio que es integrado dentro del genoma de la célula hospedera.

Los genomas de retrovirus endógenos están contenidos dentro del ADN de la línea germinal de especies animales normales y son por lo tanto, perpetuados por transmisión a través de gametos de una generación de la especie a la siguiente.

El genoma en los retrovirus es diploide; está constituido por dos moléculas idénticas de ARN en forma de hebras retorcidas unidas por enlaces de hidrógeno en varios puntos. Estos virus utilizan una única enzima viral llamada transcriptasa inversa para copiar su genoma en ADN.

La composición genética del VIH se encuentra contenida en dos cadenas idénticas de ARN, que en el VIH-1 contienen 9,749 nucleótidos y 9,671 en el VIH-2; ambos VIH poseen nueve genes: tres estructurales y el resto con función reguladora, limitados a ambos flancos por una secuencia genética denominada secuencia terminal de repeticiones largas (LTR), la cual es responsable de indicar el sitio donde se va a iniciar la lectura del genoma viral aunque también tiene la facultad de controlar ciertas funciones de la célula, con lo que se favorece la biosíntesis de los diversos componentes del VIH. Los genes estructurales poseen la información necesaria para la síntesis de los componentes virales y los genes reguladores almacenan la información necesaria relacionada con el control de la actividad de los genes estructurales, como el indicar el momento en que deben iniciar o suspender su acción, regular la velocidad de la síntesis, controlar la cantidad de componentes virales que se requiere biosintetizar, etc. (3).

Usualmente contienen tres genes estructurales: el gen gag, el cual codifica las proteínas estructurales localizadas en el interior de la partícula viral; el gen pol que codifica la transcriptasa inversa; y el gen env, el cual codifica las glicoproteínas de la envoltura (3,4).

Estudios iniciales sobre este virus revelaron su presencia en la células mononucleares de la sangre periférica particularmente en los linfocitos T ayudadores.

Posteriormente el VIH ha sido recuperado y demostrado que infecta un buen número de células. (3,5).

### 3.2.1 Ciclo de replicación del virus

El VIH se une a la molécula T4 (CD<sub>4</sub>), específicamente en los epitopos Leu 3A y DKT-4a; los cuales se encuentran en la superficie celular de los linfocitos T4, monocitos, macrófagos y células colorectales. Estas células contienen ARN mensajero para la molécula T4, la cual es una proteína que se expresa en la superficie celular. Además se encuentra presente en las células nerviosas (neuronas); por lo que constituyen un blanco más para la infección por el VIH (6-8).

Después de la unión del VIH a la molécula T4, el genoma viral entra a la célula (al citoplasma) posteriormente el ARN genómicoviral es transcrito a ADN por la enzima transcriptasa inversa viral. Luego, éste ADN forma una doble cadena y se traslada desde el citoplasma celular hacia el núcleo, donde se integra al ADN celular; esto lo realiza una enzima integrasa, codificada por el virus. El ADN viral que no ha sido integrado al ADN celular, se encuentra en el citoplasma, lo que es común para todos los retrovirus citopáticos. Esto constituye un marcador de efectos citopáticos o es fundamental para los procesos patológicos que induce el virus, pero esto solamente es una hipótesis que no ha sido confirmada. La pequeña porción del ADN viral que fue integrada al ADN celular, se le denomina provirus (8-10).

Las células infectadas con el VIH que son expuestas a estimulaciones (otros agentes patógenos, por ejemplo Herpes simplex virus -HSV) continúan con el ciclo de replicación del VIH; puesto que en la activación celular se lleva a cabo

la transcripción del genoma viral en ARN con la subsiguiente síntesis de proteínas virales. Este ARN genómico y las proteínas virales se reúnen en la superficie de la célula, formándose nuevamente el virus y estos posteriormente "brotan" de la célula completándose así, el ciclo de reproducción del VIH (Figura No. 1) (8,9).

### **3.3 Modo de Transmisión**

La forma en que se transmite el VIH tiene un patrón específico, consistente en el intercambio directo entre fluidos corporales de una persona infectada a una sana (9,10). Es por eso, que el VIH se transmite a través de relaciones sexuales entre homosexuales, bisexuales y heterosexuales (11,12), ésto incluye el acto sexual penetrativo vaginal, anal y oral (13). Además, el VIH se disemina por medio de las transfusiones sanguíneas (14,15) y de sus productos (factor VIII y IX) en personas hemofílicas (14); el personal que manipula sangre o fluidos corporales y que accidentalmente entran en contacto con los mismos (16); en la reutilización de agujas hipodérmicas no esterilizadas en drogadictos o por descuido del personal médico (17).

Dentro de las formas de transmisión antes mencionadas es importante hacer énfasis en la transmisión heterosexual, pues el virus se transmite durante el coito vaginal y tanto el hombre como la mujer pueden infectarse de este modo aunque no está establecido sin embargo, si el riesgo de infección es el mismo en la mujer que en el hombre, tampoco se ha establecido claramente la facilidad con que se transmite el virus durante el coito vaginal, o cuales son las probabilidades de contraer la infección con un sólo acto

sexual con una persona infectada (18); El VIH puede entrar en contacto con la circulación sanguínea a través de una herida o cortada, como ocurre en procedimientos médicos tradicionales (19), o en ritos culturales (infibulación y circuncisión femenina) practicados en algunas regiones del Africa (20).

Las madres infectadas pueden transmitir el VIH hacia los niños y puede ocurrir in útero, durante el parto o post-parto por medio de la lactancia (21-23).

El VIH-1 ha sido aislado de sangre, semen y líquido cefalorraquídeo en mayor concentración que en lágrimas, saliva, leche materna, orina y secreciones cervicales y vaginales. También ha sido obtenido del tejido cerebral, nódulos linfáticos, médula ósea y epidermis, aunque no se han reportado casos de infección (22,24).

### **3.3.1 Mecanismos de Transmisión Heterosexual**

Las relaciones sexuales han sido las responsables, en la mayor parte, de la diseminación de la infección por VIH en poblaciones de homosexuales activos. Sin embargo, la súbita aparición del síndrome de linfadenopatía en las parejas heterosexuales de hemofílicos, heroinómanos y haitianos infectados, sugirió que la ruta de infección podría darse a través de relaciones heterosexuales (24,25).

Estudios que se llevaron a cabo en Africa Central, han demostrado que la promiscuidad heterosexual es un factor potencial para la propagación de la infección por VIH (26). En los Estados Unidos de Norteamérica se ha establecido que el uno por ciento (1%) de los pacientes infectados, refieren este tipo de relación sexual; en la cual, solamente su

pareja heterosexual estaba infectada con el virus y no pertenecían a grupos de riesgo (27).

El desarrollo del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), entre las parejas heterosexuales de pacientes heroínómanos, reveló que el VIH podía transmitirse de varón a mujer, aunque siempre quedaba la duda, si éstas parejas hubieran podido utilizar la misma aguja de sus compañeros sexuales (28). Estos estudios dieron el apoyo necesario a la hipótesis de que ocurre transmisión heterosexual de varón a mujer y viceversa.

#### **3.3.1.1 Transmisión de varón a mujer**

Actualmente la transmisión varón-mujer, está demostrada en base a las siguientes razones:

Estudios de parejas de pacientes seropositivos, muestran la seropositividad al VIH (29).

Mujeres que fueron inseminadas artificialmente con espermatozoides contaminados, desarrollaron la infección con VIH (30).

Un chimpancé hembra de cuatro años de edad, fue infectada, cuando se le inoculó VIH intravaginalmente y sin traumatismos (31).

El aislamiento del VIH presente en los linfocitos del semen (32).

Prostitutas infectadas, que no pertenecían a otro grupo de riesgo (33).

Por otro lado, en los países subdesarrollados, donde se ha evidenciado la transmisión heterosexual (Zaire, Rwanda, Haití), se le atribuye a la promiscuidad heterosexual, como un factor de riesgo. En Zaire, la



relación seroepidemiológica de varón-mujer es de 1.1:1 lo que dió origen también a la siguiente hipótesis: - es posible la transmisión mujer-varón.

#### **3.3.1.2. Transmisión de mujer a varón**

Entre los estudios realizados al respecto, existe gran controversia acerca de este tipo de transmisión. Pero así como se aisló el VIH del semen, también se ha aislado de las secreciones cervicales y vaginales en mujeres seropositivas, en ausencia de su ciclo menstrual y durante el mismo (34).

En Rwanda, los varones heterosexuales, que mantienen relaciones sexuales con prostitutas, poseen alta prevalencia de infección por VIH, los cuales se compararon con los heterosexuales que niegan tener ese tipo de relación (35).

El intercambio de secreciones vía genital-genital, genital-anal, oral-genital, oral-anal y oral-oral, pueden jugar un papel importante en la transmisión del virus.

#### **3.3.1.3 Factores asociados a la transmisión heterosexual**

En estudios realizados sobre los factores que favorecen la transmisión del virus, se ha encontrado que las relaciones anales en general, están asociadas a la alta tasa de infección con VIH. Esto se debe a que la mucosa del recto es muy susceptible a cualquier traumatismo por pequeño que sea, por lo que se favorece un ambiente ideal para que ocurra la transmisión del VIH (36).

Existe la posibilidad que se lleve la infección, más frecuentemente durante el ciclo menstrual, en cualquier dirección, pero ésto aún está en duda, sin ninguna conclusión aparente (37).

Por otro lado, la promiscuidad de la población heterosexual parece ser un factor muy importante en la diseminación del VIH. Por último, el uso o no de preservativos o espermicidas parecen tener mucha relación con la infectividad del VIH (38). Esto es aplicable tanto en homosexuales como en heterosexuales.

### **3.4 Manifestaciones Clínicas**

Las manifestaciones clínicas producidas por la infección del VIH presenta diferentes formas. Desde la falta total de síntomas, hasta ligeros malestares, desórdenes neurológicos, enfermedades oportunistas y mortales. La infección aguda es generalmente asintomática, pero se han descrito varios síndromes clínicos. Lo que ocurre más frecuentemente es la aparición de un síndrome febril agudo, parecido al de otros procesos virales no específicos (39).

El cuadro suele presentarse entre la primera y la sexta semana a partir de la infección.

Hay fiebre, malestar general, mialgias, artralgias, dolor de garganta, sudoración. A veces se presentan trastornos digestivos, tales como náuseas, vómitos y diarreas, erupción y síndrome adénico generalizado con ganglios de caracteres inflamatorios, agudos, inespecíficos.

Se ha descrito cefalea y fotofia por ligera reacción meníngea, pero a veces predomina un cuadro de franca meningoencefalitis, puede haber mielopatía (37-40).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolló una definición de caso clínico de SIDA para los pueblos de escasos recursos, la cual en algunos casos todavía se sigue

utilizando, más sin embargo, el sistema de clasificación más actualizado es el definido por el Centro de Control de Enfermedades en Atlanta, USA (CDC), el cual revisó el sistema de clasificación para la infección por el VIH enfatizando la importancia clínica del recuento de linfocitos T CD4 en la categorización de condiciones clínicas relacionadas al VIH, ya que, al disminuir el número de linfocitos T CD4, el riesgo y la severidad de las enfermedades oportunistas aumenta (41).

El sistema de clasificación para la infección por el VIH entre los adolescentes (mayores o igual a 13 años) y adultos ha sido revisada para incluir el recuento de linfocitos T CD4 como un marcador para inmunosupresión relacionada al VIH. El sistema de clasificación revisada por el CDC para adolescentes y adultos infectados por el VIH está basado en tres niveles de recuentos de linfocitos T CD4 y tres categorías clínicas estando representado por una clasificación de nueve categorías (Cuadro 3).

#### **Categorías Linfocito T CD4**

Las tres categorías de linfocitos T CD4 fue definida como sigue:

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
BIOLOGÍA

*Categoría 1:* mayor o igual a 500 células/ul

*Categoría 2:* 200-499 células/ul

*Categoría 3:* menor a 200 células/ul

Estas categorías corresponden al recuento de linfocitos T CD4 por microlitro de sangre, guía clínica y acciones terapéuticas en el manejo de adolescentes y adultos infectados por el VIH (42).

### 3.5 CATEGORIAS CLINICAS

Las categorías clínicas de la infección por el VIH fue definida como sigue:

#### **CATEGORIA A**

Consiste en una o más de las condiciones en adolescentes o adultos con infección documentada a VIH.

- Infección por VIH asintomático
- Linfadenopatía generalizada persistente
- Infección por el VIH (primaria) aguda con enfermedad acompañante o historia de infección aguda por el VIH.

#### **CATEGORIA B**

Consiste en condiciones sintomáticas en un adolescente o adulto infectado con el VIH que no se incluyen en la categoría C y que cumple al menos uno de los siguientes criterios: **a)** las condiciones son atribuibles a la infección por el VIH o son indicativas de deficiencia en la inmunidad mediada celularmente; o **b)** las condiciones son de un curso clínico o requiere manejo que es complicada por la infección por el VIH. Ejemplo de éstas condiciones incluye, pero no se limitan a:

- Angiomitosis bacilar
- Candidiasis orofaríngea
- Candidiasis vulvo vaginal; persistente o recurrente o con pobre respuesta al tratamiento
- Displasia cervical ( moderada o severa ) / carcinoma cervical in situ
- Síntomas constitucionales como fiebre ( 38.5°C ) o diarrea persistente mayor de 1 mes
- Leucoplaquia vellosa o pilosa oral

- Herpes zoster, afectando al menos dos distintos dermatomas o episodios
- Púrpura trombocitopénica idiopática
- Listeriosis
- Enfermedad inflamatoria pélvica particularmente si está complicada con abscesos tubo-ováricos
- Neuropatía periférica.

Para propósitos de clasificación. Las condiciones de la categoría B proceden sobre las de categoría A.

### **CATEGORIA C**

Esta incluye las condiciones clínicas enlistadas en la siguiente definición:

- Candidiasis bronquial, tráquia o pulmones
- Candidiasis Esofágica
- Cáncer cervical invasiva
- Coccidioidomicosis, diseminados o extrapulmonar
- Criptosporidiosis intestinal crónica (duración mayor de 1 mes)
- Citomegalovirus ( otro hígado, bazo o ganglio linfáticos)
- Retinitis citomegalovirus (con perdida de la visión)
- Encefalopatía, relacionada al VIH
- Herpes simple: úlceras crónicas (mayor de 1 mes); o bronquitis, neumonitis o esofagitis
- Histoplasmosis, diseminada o extrapulmonar

Este sistema de clasificación para el VIH revisado provee criterios uniformes y simples facilitando esfuerzos para una sencilla evaluación, cuidado futuro y referencias

necesarias para personas con la infección por el VIH (42,43).

### 3.6 DIAGNOSTICO

#### 3.6.1 Diagnóstico serológico

El diagnóstico de la infección por VIH se establece comunmente por medio de pruebas destinadas a la detección de anticuerpos contra el virus. Entre éste grupo de pruebas serológicas, el ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA) ha sido la prueba más comúnmente utilizada al igual que otras modificaciones de la misma. Otras pruebas utilizadas incluyen aglutinación de partículas de gelatina, pruebas rapidas, western blot, radioinmunoprecipitación, inmunofluorescencia indirecta y otras. Sin embargo, los ensayos usados para determinar la seroconversión difieren en sensibilidad y especificidad. Western blot es considerado por muchos como el más específico, por lo cual ha sido recomendado como una prueba diagnóstica confirmativa al igual que radioinmunoprecipitación e inmunofluorescencia (44).

Existen también, las pruebas de primera generación que usa antígenos obtenidos de cultivos de células infectadas, (aglutinación de partículas de gelatina), las de segunda generación que utilizan proteínas virales sintéticas producidas por métodos de recombinación de ADN y las de tercera generación que permiten la detección simultánea de anticuerpos IgG e IgM, anti VIH-1 y anti VIH-2.

### **3.6.2 PRUEBAS DE TAMIZAJE**

#### **3.6.2.1 Aglutinación de Partículas de Gelatina (PA)**

La prueba de aglutinación de partículas de gelatina (PA) se basa en el mismo principio de la prueba de aglutinación pasiva convencional. El virus purificado es lisado con un detergente y las proteínas virales resultantes son usadas para sensibilizar partículas de gelatina activadas con ácido tánico. Si el anticuerpo específico está presente se forman grumos por la reacción de los anticuerpos entre las partículas sensibilizadas. El patrón de aglutinación puede ser observado a simple vista. PA es una prueba altamente específica (45,46,54).

Los resultados falsos positivos pueden producirse por fijación inespecífica de las inmunoglobulinas a fases sólidas hidrofóbicas. Por eso, las partículas son hechas de gelatina y goma arábiga, que son hidrofílicas y así se reducen grandemente las reacciones inespecíficas en esta prueba. Comparada con otros ensayos que utilizan como transportadores eritrocitos de animales, látex, poliestireno y polivinil, PA produce significativamente menos reacciones inespecíficas (47,48).

#### **3.6.2.2 Ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA)**

Ha sido usado ampliamente en todo el mundo. Este método utiliza un lisado viral proveniente de un cultivo celular. Los antígenos virales son adsorbidos sobre perlas o en pozos plásticos para microtitulación. La muestra de suero es incubada con los antígenos y si están presentes los anticuerpos anti-VIH, estos reaccionan y son detectados posteriormente por un segundo anticuerpo marcado con una

enzima que a su vez es evidenciado por una reacción enzimática que produce un color directa o inversamenteproporcional a la cantidad de anticuerpos séricos presentes (49,50). La densidad óptica de la muestra de suero es comparada con un control positivo y negativo, probados simultáneamente (51). Cada conjunto de pruebas tiene diferente valor límite, por arriba del cual una reacción se define como positiva. El valor límite es seleccionado con el fin de optimizar la sensibilidad y especificidad de la prueba (43,52).

Los ELISA han sido utilizados como pruebas de tamizaje en donadores de sangre para prevenir la transmisión y diseminación del virus. Aunque la prueba es sensible y útil para la detección de anticuerpos, claros casos de falsos positivos se han notificado en este ensayo. Además requiere de instrumentos caros tales como un fotómetro (lector de ELISA) y un lavador de placas de microtitulación (44,53,54).

### **3.6.2.3 ELISA-Péptido Sintético**

Esta prueba detecta anticuerpos contra el VIH y usa péptidos sintéticos como antígenos, utilizando la secuencia de gp41, pues los pacientes con SIDA o Complejo Relacionado a SIDA (CRS) presentan predominantemente anticuerpos contra esta glicoproteína (55,65,66).

También han sido utilizados antígenos protéicos de los genes gag, pol y env, pero la reactividad ha sido nula o débilmente demostrable. Los péptidos sintéticos tienen la ventaja de que pueden sintetizarse en grandes cantidades, las pruebas son altamente reproducibles y además se elimina casi por completo las reacciones inespecíficas porque no



existen antígenos de histocompatibilidad o proteínas bacterianas endógenas. La especificidad de algunas de éstas pruebas ha resultado ser similar o superior a WB, por la cual también se recomiendan como pruebas de confirmación en países en desarrollo, por la escasez de recursos de algunas poblaciones (56,65).

#### **3.6.2.4 Fosfatasa Alcalina (AP)**

Esta prueba utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales (coctail) de anti-p14, p24 y gp120, para la detección de antígenos en linfocitos infectados, luego se hace reaccionar una antigammaglobulina marcada con fosfatasa que se unirá a los anticuerpos y se evidencia con un sustrato de la enzima. Puede detectar hasta una célula en cinco mil; exhibiendo una coloración típica (54,65).

### **3.6.3 PRUEBAS RAPIDAS**

#### **3.6.3.1 Aglutinación Látex (LA)**

La prueba de aglutinación de partículas de látex utiliza polipéptidos codificados por el gen env, que son producidos por ingeniería genética para el recubrimiento de las partículas., las cuales aglutinan ante la presencia de anticuerpos contra el virus. LA es un ensayo sumamente sencillo que sólo requiere de 3 minutos de incubación a temperatura ambiente en un rotador (57,59,65).

#### **3.6.3.2 Akudex Akucheck-VIH test**

Consiste en un aparato plástico con una membrana con anticuerpos y antígenos inmovilizados contra VIH, donde a la muestra se le permite reaccionar contra los anticuerpos y con el conjugado coloidal de oro. Los reactivos de captura son la proteína recombinante, que corresponde a la región de

traslape en la unión entre los fragmentos de las proteínas de envoltura gp-120 y gp-41 de los virus.

#### 3.6.4 OTRAS

Otras variantes de los ELISA incluyen la tira reactiva de inmersión (DS) que es una modificación del ELISA directo en la cual, una tira de poliestireno es recubierta con un lisado de VIH de células H9. Otra modificación es la prueba de ELISA de Captura de Antígeno (AC). La captura del antígeno se realiza por medio de anticuerpos específicos de conejo anti-VIH (p24) fijados en cubetas de microdilución. Subsecuentemente, la detección del antígeno, si está presente en el suero, se hace por anticuerpos de conejo anti-VIH, seguido de un anticuerpo IgG de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa. La prueba de ELISA de Transcriptasa Inversa (RT), que también se basa en el mismo principio de (AC), es un ensayo de polimerasa bien caracterizado, que usa un precursor de un nucleótido trifosfato tritiado, para su incorporación al ADN por la acción de la polimerasa viral. Este ensayo no es útil para el análisis de una gran cantidad de muestras ya que requiere para la detección de una tediosa colección de ADN producido entre filtros de vidrio (45,60,61,65).

Es interesante mencionar que los sueros africanos tienen la reputación de producir una alta tasa de resultados falsos positivos en pruebas de tamizaje del VIH-1; las razones que han sido sugeridas para la explicación de este fenómeno son la presencia de anticuerpos de reacción cruzada y/o de complejos inmunes circulantes en pacientes con infecciones parasíticas pasadas o presentes. Por lo tanto,

una reactividad atípica en ELISA podría ser interpretada como una temprana seroconversión del VIH, reactividad cruzada con otros retrovirus humanos que son ampliamente prevalente en Africa Central y Africa Occidental, o bien, reactividad con una proteína indeterminada endógena o exógena. Entre las causas a las que se atribuye en cierta medida la producción de resultados falsos positivos en ELISA están las enfermedades tropicales tales como la malaria y la enfermedad de Chagas, transfusiones múltiples que pueden inducir el desarrollo de anticuerpos contra leucocitos humanos en los cuales se cultiva el virus y trastornos hepáticos provocados por el alcohol (46,65).

### 3.6.5 PRUEBAS CONFIRMATORIAS

#### 3.6.5.1 Western Blot (WB)

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

Al igual que ELISA, WB detecta anticuerpos IgG. Este método utiliza viriones purificados provenientes de cultivos virales en células H9 infectadas. Los viriones son bandeados por centrifugación en gradiente de sucrosa, luego se solubilizan en dodecil-sulfato de sodio y 2-mercaptoetanol y se fracionan por electroforesis sobre un gel de poliacrilamida. Posteriormente, los antígenos (proteínas y glicoproteínas de peso molecular variado) se transfieren electroforéticamente a papel de nitrocelulosa y los anticuerpos monoclonales de ratón anti IgG humano marcados con  $I^{125}$  (49,65).

En WB, una prueba positiva se define por la presencia de al menos una banda reactiva correspondiente a las proteínas codificadas por el gen *gan* (p17, p24, p55) y además, al menos una banda reactiva correspondiente a las

proteínas codificadas en el gen env (gp41, gp120, gp160). WB es más específico si se encuentra reacción en la endonucleasa (p31) y en la transcriptasa inversa (p51, p66) que la convierten en una prueba positiva (50,58,65).

Comúnmente los pacientes con SIDA demuestran una predominante reacción a p24 y gp41 por WB, así como también a otras proteínas codificadas por el gen gag (p14, p18 y pr55) y a la proteína gp140 codificada por el gen env. La reactividad a p66/51 y a p31 también es frecuente. WB es utilizado como una prueba confirmatoria, sin embargo, existen algunos reportes de resultados serológicos divergentes y de resultados falsos positivos (51,65).

#### **3.6.5.2 Inmunofluorescencia Indirecta (IFA)**

En este método, el suero reacciona con células infectadas con VIH. Los anticuerpos contra el virus se fijan en varios lugares a las células infectadas, estos anticuerpos son evidenciados con una anti-gammaglobulina humana de carnero marcada con fluoresceína y se lee en un microscopio de fluorescencia. Las muestras positivas se identifican por una fluorescencia verde manzana brillante en una proporción dada de células. Esta es una prueba confirmatoria, sin embargo, necesita de personal experimentado para su interpretación (53,65).

#### **3.6.5.3 Radioinmunoprecipitación (RIPA)**

Este método es muy específico para el VIH, sin embargo es caro y laborioso, además requiere de radioisótopos para marcaje y su interpretación deberá realizarse cuidadosamente. El suero reacciona con un lisado de células infectadas con VIH como sustrato para la inmunoprecipitación

y subsecuentemente se realiza una electroforesis, posteriormente el resultado es evidenciado revelando la radioactividad de las bandas producidas por competencia de anticuerpos. El lisado celular es rico en antígenos de envoltura del virus relativamente no desnaturalizados y se usa para definir diferencias antigénicas entre varios virus de inmunodeficiencia humanos y de simios. RIPA parece ser más sensible que WB para los antígenos de envoltura de alto peso molecular (gp120 y gp160) (52,62,65).

#### **3.6.5.4 Citoinmunoperoxidasa (CIP)**

CIP utiliza células infectadas con VIH que se incuban con el suero del paciente, posteriormente se agrega un anti IgG humano marcado con peroxidasa y luego el sustrato. La lectura se realiza mediante un microscopio de luz y se observa la coloración inmunoenzimática de las células cuando hay anticuerpos anti-VIH presentes. Es un método muy sensible y específico pero necesita de personal experimentado para su interpretación.

#### **2.6.5.5 Diagnóstico Viroológico**

Este tipo de pruebas detecta únicamente la presencia del virus y gran parte de las mismas han sido destinadas casi exclusivamente a la investigación por su alto costo y equipo sofisticado (54,65).

### **3.7 EPIDEMIOLOGIA**

Desde que el SIDA se conoció en el mundo y fueron establecidos los grupos de riesgo, se han hecho diversidad de estudios encaminados a conocer la distribución de la enfermedad dentro de los mismos, cómo prevenirse y sus principales formas de transmisión dentro de los diferentes

grupos, tal es el caso de los homosexuales que es el grupo más estudiado, los hemofílicos, drogadictos, prostitutas, estudios en receptores y donadores de sangre, gineco-obstétricos y hasta en prácticas que forman parte de la cultura de los países, tal es el caso de estudios de poblaciones en África y Zaire (63).

En Guatemala como todos los países del mundo se han tomado medidas de prevención contra este síndrome, a través de la formación de la Comisión de Vigilancia y Control del SIDA. La comisión ha establecido normas y distribuido información básica sobre varias preguntas que la población se hace respecto al SIDA, así como recomendaciones sobre medidas de prevención sobre el manejo de muestras para personal hospitalario, de laboratorio, odontología, banco de sangre, pacientes, funerales y salas de necropsias, además de la realización de algunos estudios epidemiológicos en grupos de alto riesgo y la asesoría de elaboración de tesis sobre SIDA.

En Guatemala los primeros casos de SIDA fueron reportados durante el segundo semestre de 1984 y de esa fecha hasta enero de 1994 se han reportado 489 casos de SIDA y 590 portadores asintomáticos lo cual hace un total de 1079 diagnósticos de la infección por el VIH.

La distribución por sexo de personas asintomáticas es de 181 mujeres y 149 hombres, y casos de SIDA de 75 mujeres y 414 hombres. Es importante hacer notar que en la información del último período, la relación hombre-mujer ha sido de 2:1 respectivamente (63).

El rango de edad que reporta mayor número de casos de infección por el VIH es el comprendido entre los 20 a 34 años de edad y de los departamentos Guatemala reporta el mayor número, seguido por Quetzaltenango y luego Izabal.

Los estudios de epidemiología realizados por la Dirección General de Servicios de Salud (DGSS) son llevados a cabo con apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la Agencia Internacional para el Desarrollo (AID) y otras organizaciones nacionales e internacionales (63).

#### 4. JUSTIFICACIONES

Tomando en cuenta los escasos recursos económicos que prevalecen en nuestro medio, se necesita contar con pruebas de tamizaje para el VIH las cuales sean confiables y de bajo costo y la OMS ha recomendado una serie de estrategias con las cuales, dependiendo del objetivo de la realización de la prueba, se pueda dar un diagnóstico sin llegar así a la realización del Western Blot (WB), ya que es una prueba sumamente cara y que en la mayoría de casos podría no representar en realidad ningún beneficio adicional.

Hasta el momento, se ha demostrado en distintos estudios, que las combinaciones de los ELISA y/o pruebas rápidas y sencillas como ensayos inmunoenzimáticos de punto (dot) y pruebas de aglutinación, dan resultados tan confiables como la combinación ELISA/WB y en algunos casos son más confiables a un costo muy inferior. Por lo tanto, en el presente estudio se midió la sensibilidad de los distintos juegos de reactivos que actualmente se encuentran en el mercado utilizando las recomendaciones que la OMS plantea.



## 5. OBJETIVOS

- 5.1 Medir la sensibilidad de los diferentes juegos de reactivos que actualmente se encuentran disponibles en Guatemala.
  
- 5.2 Evaluar las estrategias diagnósticas de infección por el VIH, basado en la combinación de pruebas de tamizaje y en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, demostrando que los resultados son tan confiables como la combinación ELISA/WB y a un costo muy inferior.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA,  
Biblioteca Central.

## 6. HIPOTESIS

Las combinaciones de ELISA y/o pruebas rápidas y sencillas, como los Enzimoimmunoanálisis y pruebas de aglutinación, dan resultados tan confiables como la combinación ELISA/WB y a un costo muy inferior.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 Universo de trabajo

Se analizaron por ELISA's y Aglutinación de Partículas de Gelatina un total de 123 sueros del banco de sueros de CODETS, los cuales se alicuotaron en viales de siete grupos, y ya han sido confirmados con Western Blot.

### 7.2 Procedimiento

#### 7.2.1. **Recolección de las muestras**

Se alicuotaron del banco de sueros de CODETS 123 sueros, tomando en cuenta como único requisito que éste contenga suficiente cantidad de muestra, para ser alicuotado en 7 porciones con una cantidad de aproximadamente 150 ul cada vial, los cuales fueron identificados y ordenados por medio de códigos.

Los viales con alicuotas de 150 ul. debidamente identificados, fueron congelados a  $-65^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis por ELISA's y PA.

#### 7.2.2. **Procesamiento y Análisis de las muestras e Interpretación de los Resultados.**

Los sueros fueron analizados por ELISA's y PA, y los resultados se interpretaron en base a los patrones de positividad establecidos por cada casa comercial. A continuación se describen las técnicas de los ELISA y PA.

### 7.2.2.1. Técnica de Aglutinación de Partículas de Gelatina (PA)

Usando este principio de aglutinación, la presencia de anticuerpos anti-VIH-1 puede identificarse visualmente mediante el hallazgo de partículas aglutinadas en la muestra de suero analizada.

Colocar tres gotas (75 ul) del diluyente de muestra en el pozo 1 y 1 gota (25 ul) en los pozos 2 y 3 empleando una micropipeta automática (25 ul).

Añadir 25 ul de la muestra en el pozo 1 usando una micropipeta y mezclar el contenido, aspirándolo y desechándolo repetidamente con la micropipeta por 3 ó 4 veces. A continuación llenar la micropipeta con 25 ul de la solución diluida en el pozo 1 y transferir 25 ul al pozo 2. Mezclar bien la solución en el pozo 2, transferir 25 ul al pozo 3 siguiendo los pasos indicados para el pozo 1, repetir el procedimiento de nuevo en el pozo 3 para obtener la tercer dilución y desechar 25 ul del pozo 3.

Colocar una gota (25 ul) de las partículas no-sensibilizadas en el pozo 2 y una gota (25 ul) de partículas sensibilizadas en el pozo 3 empleando el gotero suministrado en el Kit.

Mezclar el contenido de los pozos vigorosamente empleando un vibrador automático, o en su ausencia efectuarlo manualmente. Cubrir la placa con un covertop de plástico y dejar en reposo horizontalmente a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 2 horas.

Leer los patrones e interpretar los resultados de acuerdo a los criterios específicos (cuadro 1 y 2).

#### **7.2.2.2. Técnica Enzygnost Anti-VIH 1/-VIH 2**

Se usó un Kit comercial Enzygnost Anti-VIH 1/-VIH 2 (Bhering) de 2 x 96 determinaciones. A continuación se describen los trabajos preliminares de dicha prueba:

Llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente sin sacar las placas del sobre de aluminio.

**Solución de lavado:** Para cada placa diluir 20 ml. de Solución de lavado POD con agua destilada y desmineralizada para obtener 400 ml.

**Cromógeno:** Para cada placa diluir 1 ml. de cromógeno con 10 ml. de Solución de Cromógeno.

#### **Lavado Previo de la Placa de Prueba**

Extraer la placa del sobre de aluminio. Lavar 1 vez con aproximadamente 0.3 ml. de solución de lavado cada microcubeta.

Dosificación de la Solución Tampón para muestras en cada uno de los pocitos.

#### **Distribución de las Muestras**

Colocar en 4 pocitos 50 ul de control negativo, en 2 pocitos más 50 ul de control positivo y luego suero sin diluir hasta completar el número de pruebas.

#### **Incubación de la Muestra**

Cubrir con un folio adhesivo e incubar por  $30 \pm 2$  minutos a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

### **Preparación de la Solución del Conjugado**

Para cada placa diluir 0.5 ml. de Conjugado Anti IgG Humana POD. con 12.5 ml. de Tampón Conjugado. Mezclar sin formar espuma.

### **Lavado**

Retirar la hoja adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocitos y lavar 4 veces con aproximadamente 0.3 ml. de Solución de Lavado. Secar la placa invirtiéndola sobre una toalla de papel.

### **Distribución del Conjugado**

Colocar en cada pocito 100 ul de la solución de conjugado.

### **Incubación del Conjugado**

Cubrir con un nuevo folio adhesivo e incubar por  $30 \pm 2$  minutos a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

### **Lavado**

Retirar la hoja adhesiva y lavar 4 veces. Secar la placa invirtiéndola sobre una toalla de papel.

### **Distribución del Sustrato**

Colocar en cada pocito 100 ul de solución tampón de cromógeno/sustrato.

### **Incubación del Sustrato**

Cubrir con otro folio adhesivo nuevo. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

### **Reacción de Detenimiento**

Retirar la hoja adhesiva y agregar a cada pocito 100 ul de solución de parada.

El color es proporcional a la concentración de anticuerpos. Se uso para llevar a cabo la lectura el

Equipo EL 311 y el 301 (Longitud de onda 450- referencia 630)

### **Valoración del Test**

Como calcular el Cut Off:

Sumar las absorbancias de los 4 controles negativos, luego sacarle el promedio.

Valor limite = E neg. + 0.250	+ 10%}	Zona gris
	- 10%}	

\*Zona Gris: repetir la prueba

### **7.2.2.3. Técnica Abbott VIH-1 EIA Recombinante de Tercera Generación**

Se usó un Kit Abbott VIH-1 EIA Recombinante de Tercera Generación. A continuación se describen los trabajos preliminares de dicha prueba:

#### **Procedimiento.**

- Llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

1. Dispensar 150 ul de cada control o muestra (suero o plasma) en el fondo de los pocillos correspondientes de la placa de reacción (3 controles negativos y 2 controles positivos).

2. Dispensar 50 ul de diluyente de muestra en cada pocillo que contenga un control o una muestra.

3. Añadir cuidadosamente una esfera en cada cavidad que contenga un control o una muestra.

4. Cubrir con un folio adhesivo. Agitar la placa para mezclar muestras y esferas y para eliminar burbujas de aire que hayan quedado atrapadas.

5. Procedimiento A (dinámico): Incubar a  $40 \pm 2$  °C durante  $30 \pm 2$  minutos.

Procedimiento B (estático): Incubar a  $40 \pm 2$  °C durante 2 horas  $\pm$  5 minutos.

6. Retirar el folio adhesivo y desecharlo. Aspirar el líquido y lavar cada esfera tres veces con 4 a 6 ml de agua destilada o desionizada para completar un volumen total de lavado de 12 a 18 ml. En caso de utilizar un sistema Pentawash, remitirse para los procedimientos de lavado apropiados al manual del instrumento de lavado.

#### **Segunda Incubación**

7. Pipetear 200 ul de conjugado diluido en cada pocillo que contenga una esfera.

8. Cubrir con un nuevo folio adhesivo. Golpear la placa para que el líquido cubra las esferas y para eliminar burbujas de aire que hayan quedado atrapadas.

9. Repetir como esta descrito en el paso número 5.

10. Retirar el folio adhesivo y desecharlo. Aspirar el líquido y lavar cada esfera como está descrito en el paso 6.

#### **Desarrollo de Color**

11. Transferir inmediatamente las esferas a tubos de ensayo debidamente identificados.

12. Pipetear 300 ul de solución DPD recién preparada en dos tubos vacíos (blancos de sustrato) y después en cada tubo que contenga una esfera.



NOTA: Purgar el dispensador inmediatamente antes de suministrar la solución de sustrato (OPD).

13. Cubrir e incubar a temperatura ambiente durante  $30 \pm 2$  minutos.

14. Agregar 1 ml de ácido sulfúrico 1 N a cada tubo.

#### Lectura

15. Ajustar el cero del espectrofotómetro con un blanco de sustrato a 492 nm.

16. Determinar la absorbancia de los controles y de las muestras analizadas a 492 nm.

#### Cálculo de Resultados

1. Cálculo de la absorbancia promedio del control negativo (NCx)

Determinar el promedio de los valores de los controles negativos.

Ejemplo:

Control neg.	
<u>Muestra no.</u>	<u>Absorbancia</u>
1	0.040
2	0.036
<u>3</u>	<u>0.039</u>
TOTAL	0.115

$$\frac{\text{Absorbancia total}}{3} = \frac{0.115}{3} = 0.038 \text{ (NCx)}$$

Los valores individuales de los controles negativos deberán ser iguales o inferiores a 0.200 e iguales o superiores a -0.010 y deberán caer dentro del rango de 0.5

a 1.5 veces el promedio de los controles negativos independientemente del modo de incubación. Cuando la absorbancia promedio del control negativo es inferior a 0.012, podrá ignorarse el cálculo de 0.5 a 1.5 del promedio.

En este caso, todos los valores del control negativo deberán encontrarse dentro de un rango del promedio  $\pm 0.006$ . Si un valor se encuentra fuera de este rango, este valor deberá excluirse. Si más de un valor ocasional cae fuera del rango, deberán investigarse problemas técnicos.

### 2. Cálculo de la absorbancia promedio del control positivo (PCx)

Determinar el promedio de los valores de los controles positivos.

Ejemplo:

Control positivo	
<u>Muestra no.</u>	<u>Absorbancia</u>
1	0.835
<u>2</u>	<u>0.925</u>
TOTAL	1.760

$$\frac{\text{Absorbancia total}}{2} = \frac{1.760}{2} = 0.880 \text{ (NCx)}$$

Si un valor está fuera del rango de 0.5 hasta 1.5 veces el PCx, el test deberá repetirse.

Los valores individuales del control positivo deberán ser superiores o iguales a 0.400.

### 3. Cálculo del punto de corte

$$\text{Punto de corte} = \text{NCx} + 0.100$$

Ejemplo:

NCx= 0.038

Punto de corte = 0.038 + 0.100 = 0.138

#### 4. Cálculo para la determinación del P-N

Ejemplo:

NCx = 0.038

PCx = 0.880

P-N = (0.880-0.038) = 0.842

Para que el ensayo sea válido, el valor P-N deberá ser igual o superior a 0.400. Si esto no ocurre, deberá sospecharse una falla técnica o una descomposición de los reactivos y deberá repetirse el ensayo.

#### 7.2.2.4 Técnica Genelavia Mixt

Se usó un Kit Genelavia Mixt . A continuación se describen los trabajos preliminares de dicha prueba:

##### **Procedimiento.**

- Llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente.
- Hacer distribución del trabajo.
- Sin lavar la placa R1 agregar a cada pozo 80 ul de diluyente de muestra R2.
- Agregar a cada pozo 20 ul de suero o control.
- Incubar 30 minutos a 40 °C.
- Lavar en el LP-35 según el procedimiento 2, 3 ciclos y el número de pozos.
- Agregar 100 ul de conjugado R7.
- Incubar 30 minutos a 40 °C.

- Preparar OPD sustrato R8 + R9 (una pastilla por cada 10 ml).
- Lavar en el LP-35 segun el procedimiento 2, 4 ciclos y el número de pozos.
- Agregar 100 ul de sustrato a cada pozo.
- Incubar a temperatura ambiente, en un lugar obscuro, por 20 minutos.
- Agregar 50 ul de solución stop (acido sulfurico 4N).
- Leer en el LP-400. Procedimiento 41 (en placa), 42 (en columna).

#### **7.2.2.5 Técnica Wellcozyme VIH 1 + 2**

Se usó un Kit comercial Wellcozyme VIH 1 + 2. A continuación se describen los trabajos preliminares de dicha prueba:

Llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente sin sacar las placas del sobre resellable.

##### **Reconstitución y preparación de los reactivos**

**1. Conjugado:** Golpear suavemente el fondo del frasco para liberar las partículas pegadas al tapón de goma. Retirar con cuidado el contratón y verter el contenido del frasco de disolvente en el del conjugado liofilizado. Volver a colocar el tapón y dejarlo así 15 minutos, agitando e invirtiendo el frasco de vez en cuando, para favorecer la mezcla. **Nota: Una vez reconstituido, almacenarlo en la oscuridad.**

**2. Solución de lavado:** Hay que añadir al líquido lavador A aproximadamente 3,000 ml de agua destilada o desionizada de alta calidad. A la solución de líquido lavador A, ya

diluido, se le añade el liquido lavador B, vaciando por completo el frasco hasta obtener unos 3,750 ml asegurándose de disolver los cristales. **Nota: No mezclar los líquidos A y B antes de añadir el agua.**

3. **Sustrato:** El sustrato deberá constituirse añadiendo el disolvente del sustrato, pero no antes de los 15 minutos previos a su utilización, ya que dejarlo a temperatura ambiente implica su deterioro. Vaciar un frasco de disolvente en el frasco que contiene el sustrato, cerrarlo con el tapón de goma y la cubierta de plástico y agitarlo rigurosamente.

4. **Amplificador:** El amplificador debe constituirse añadiendo el disolvente del sustrato, pero no antes de los 15 minutos previos a su utilización, ya que dejarlo a temperatura ambiente implica su deterioro. Dejar el frasco del disolvente a temperatura ambiente, golpear ligeramente la base del frasco del amplificador para que se desprenda cualquier partícula adherida al tapón de goma.

Desechar el contratapón y verter el contenido de un frasco de disolvente en cada frasco de amplificador. Cerrarlo con el tapón de goma y la cubierta de plástico del disolvente del amplificador y agitarlo antes de su uso.

#### Técnica del test

**PASO 1.** Utilizar únicamente las tiras de microcubetas necesarias para el test. Extraer las tiras del marco de las microcubetas y volver a almacenar las restantes, entre 2 °C y 8 °C , en la bolsa resellable que lleva el saquito desecador. Evitar el contacto con la parte superior o inferior de las cubetas.

**PASO 2.** Utilizando una misma micropipeta y distintas puntas desechables, añadir 25 ul de muestra para test en cada cubeta, dejando 6 cubetas vacías para las muestras de control, que fueron añadidas posteriormente. DEBE utilizarse una punta diferente para cada muestra.

**PASO 3.** Añadir 25 ul de control negativo a 4 cubetas.

**PASO 4.** Añadir 25 ul de cada uno de los controles positivos (anti VIH-1 y anti-VIH-2) en otras dos cubetas.

**PASO 5.** Añadir 25 ul de disolvente de muestra a cada cubeta, teniendo cuidado de que no se produzca contaminación cruzada entre las cubetas.

**PASO 6.** Cubrir las cubetas con su tapa, e incubarlas en condiciones de humedad a 37 °C durante 30 minutos.

**PASO 7.** Es necesario reconstituir el conjugado con el disolvente 15 minutos antes de su uso.

**PASO 8.** Finalizado el período de incubación, lavar la placa utilizando:

(a) El Wellcozyme Plate Washer, en programa 1. Si no se utilizara toda la placa de cubetas habra que rellenar el resto del cuadro con tiras vacías. Retirar las tiras vacías una vez terminado el lavado.

**o bien** (b) Un lavador manual de placas.

(i) Aspirar el contenido de la primera hilera de cubetas.

(ii) Llenar completamente esta fila de cubetas con el líquido lavador, o lo que es lo mismo, hacer que sobresalga un menisco por encima del borde superior de la cubeta. Aspirar y rellenar esta

misma fila otras dos veces más, dejando las cubetas vacías.

(iii) Repetir por orden el mismo procedimiento con cada fila de cubetas.

(iv) Se recomienda invertir las cubetas y dejar que se sequen sobre papel secante, una vez terminados los pasos (i) a (iii) previos.

**o bien** (c) Wellcozyme 812 SW2 Washer.

**PASO 9.** Añadir 50 ul de solución de conjugado en cada cubeta, inmediatamente después de terminar el lavado.

**PASO 10.** Cubrir las cubetas con su tapa, e incubar a 37 °C durante 30 minutos en condiciones de humedad.

**PASO 11.** 15 minutos antes de que termine el período de incubación, preparar la solución de sustrato.

**PASO 12.** Una vez terminado el período de incubación, lavar la placa utilizando uno de los métodos:

(a) El Wellcozyme Plate Washer, en programa 2 con ciclo de remojo. Si no se utilizara toda la placa de cubetas habra que rellenar el resto del cuadro con tiras vacías. Retirar las tiras vacías una vez terminado el lavado. Es importante que el tiempo de remojo sea exactamente de 1 minuto.

**o bien** (b) Un lavador manual de placas.

(i) Aspirar el contenido de la primera hilera de cubetas.

(ii) Llenar completamente esta fila de cubetas con el líquido lavador, o lo que es lo mismo, hacer que sobresalga un menisco por encima del borde

superior de la cubeta. Aspirar y rellenar esta misma fila otras dos veces más, dejando las cubetas vacías.

(iii) Repetir por orden el mismo procedimiento con cada fila de cubetas.

(iv) Dejar embeberse la placa, pero no más de 2 minutos, comenzando a cronometrar desde que se aspira la primera hilera de cubetas (Paso (i)).

**Este remojo es muy importante.**

(v) Repetir los pasos (i) a (iii), pero dejando vacías las cubetas. Se recomienda invertir las cubetas y dejar que se sequen sobre papel secante, una vez terminado el lavado.

o bien (c) Wellcozyme 812 SW2 Washer.

**PASO 13.** Inmediatamente después de lavar la placa, añadir 50 ul de solución de sustrato en cada cubeta. No dejar que las cubetas estén vacías durante más de un minuto.

**PASO 14.** Cubrir las cubetas con una tapa e incubar a 37 °C durante 20 minutos en condiciones de humedad.

**PASO 15.** Recontiuir la Solución de amplificador 15 minutos antes de que termine el período de incubación.

**PASO 16.** Añadir 100 ul de solución con amplificador a cada cubueta.

**PASO 17.** Incubar durante 10 minutos exactos a una temperatura entre 20 °C y 25 °C, mientras se revela el color. Evitar la luz del sol directa. En las cubetas que contengan muestras positivas, aparecerá un color rojo.

**PASO 18.** Añadir 50 ul de solución de parada (ácido sulfúrico 2M) a cada cubeta.



**PASO 19.** Leer la absorción de cada cubeta a 492 nm ( $A_{492}$ ), utilizando un lector de placas. Si se utiliza un lector de placas con posible elección de dos longitudes de onda, seleccionar el 690 como longitud de onda de referencia. Leer el blanco (sin placa en el carro). **Antes de la lectura, asegurarse de que la superficie del fondo de las cubetas este limpia y seca.**

**PASO 20.** Calcular la media  $A_{492}$  de las cuatro cubetas negativas control.

### **Resultados**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

Se determinó la presencia o ausencia de anticuerpos anti VIH-1 o VIH-2 en relación con la absorción media de las cuatro lecturas de las Muestras negativas control. Las muestras con una lectura de absorción igual o superior al control negativo + 0.20 se consideran reactivas para anticuerpos anti-VIH.

Para determinar la validez de los resultados del test, se utilizaron las lecturas de absorción de las muestras control positivas y negativas.

### **Cálculos de resultados**

**1. Control negativo:** Dado por supuesto que la  $A_{492}$  de cada una de las cuatro cubetas negativas de control cumplirán con los criterios de control de calidad, se calculará la absorción media de los sueros de control negativo (NCx).

Ejemplm: Absorciones de los control negativo;

Cubetas: 1= 0.214

2= 0.184

3= 0.190

4= 0.208

Total= 0.796

NCx= 0.796/4= 0.199

En este caso, la absorción media de los 4 controles negativos sería de 0.199 .

Si una de las cubetas de los control negativo tubiera una  $A_{492}$  superior en más de 0.20 a la media de los 4, habrá que desestimar ese valor y hacer otra nueva media  $A_{492}$  con los otros 3 valores.

**2. Valor de "corte".** El valor de corte se calculará sumando 0.20 a la media de los negativos control.

Media de control negativo= 0.199

Valor de corte= 0.199 + 0.200 = 0.399

### **3. Muestras para el test:**

Se compararon las absorciones de las muestras analizadas con el valor de corte.

#### **Inrterpretación de resultados**

1. Resultado no-reactivo: Los especímenes con una absorción menor que la del valor de corte fueron considerados no-reactivos (negativos), en cuanto a anticuerpos VIH, por el Wellcozyme VIH 1 + 2 test.

2. Resultado reactivo: Los especímenes con una absorción igual o superior que la del valor de corte fueron considerados inicialmente reactivos en ese ensayo y deberá hacerse de nuevo el test por duplicado con la misma muestra.

Las muestras que sean reactivas al menos en uno de éstos dos test, se considerarán reactivas repetidamente al Wellcozyme VIH 1 + 2 test, presumiéndose que contienen anticuerpos VIH. Si ambas reacciones de confirmación resultaran no-reactivas, la muestra se considerará no-reactiva en cuanto a anticuerpos VIH.

3. Este ensayo no indica si los anticuerpos detectados son contra el VIH-1 o el VIH-2. Para confirmar esta primera observación y distinguir el tipo de virus, hay que realizar otros test.

#### **7.2.2.6 Técnica Retro-Tek VIH ELISA**

Se usó un Kit Retro-Tek VIH ELISA. A continuación se describen los trabajos preliminares de dicha prueba:

##### **Procedimiento de la Prueba.**

1. Llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente sin sacar las placas de la bolsa resellable.
2. Prediluir todas las muestras y controles 1/21, usando en el siguiente protocolo.

**Control Positivo:** Agregar 45 ul de suero control positivo a 900 ul de diluyente de muestra conjugado en un tubo de ensayo.

**Control Negativo:** Agregar 45 ul de suero control negativo a 900 ul de diluyente de muestra conjugado en un tubo de ensayo.

**Muestra:** Agregar 15 ul de suero a 300 ul de diluyente de muestra conjugado en un tubo de ensayo.

3. Usar una micropipeta automática ajustada a 200 ul y agregar 200 ul de la muestra prediluida en cada pocito de la

microplaca, (del pocito H-1 en adelante se analizaron las muestras). Cada muestra por separado deberá ser evaluada en pocitos diferentes.

4. Agregar 200 ul del suero control positivo prediluido en 4 pocitos diferentes ( B-1, C-1, D-1, E-1 ).

5. Agregar 200 ul del suero control negativo prediluido en 2 pocitos diferentes ( F-1 y G-1 ).

NOTA: El A-1 se utiliza como blanco en el cual se le agregará sólo diluyente de muestra conjugado.

6. Cubrir la microplaca con un folio adhesivo para prevenir la evaporación e incubar 1 hora  $\pm$  5 minutos a 37°C.

7. Aspirar todo el contenido de la placa con un lavador automático y lavar cada pocito 6 veces agregandoles el buffer de lavado

8. Agregar 200 ul de solución de trabajo del conjugado a cada pocito.

9. Cubrir la microplaca con un folio adhesivo nuevo e incubar por 60 minutos  $\pm$  5 minutos a 37°C.

10. Aspirar el contenido de los pocitos y lavar 6 veces.

11. Agregar 200 ul de sustrato previamente reconstituido en cada pocito de la microplaca.

12. Cubrir la microplaca con un folio adhesivo nuevo e incubar por 20 minutos  $\pm$  5 minutos a 37°C.

13. Detener la reacción agregandole 50 ul de solución de parada a cada pocito de la microplaca.

14. Leer la absorbancia de cada pocito en el rango de 60 minutos luego de haber agregado la solución de parada.

**Calculo de resultados.**

**(A) Determinación de la media de los controles negativos:**

Luego de ajustar el blanco efectuar las lecturas de absorbancia de los controles negativos sumando ambos resultados y dividiéndolos dentro de dos. El promedio esperado de los controles negativos deberá de estar comprendido dentro del rango de 0.000 D.O. a 0.200 D.O.

#### **7.2.2.7 Técnica Recombigen VIH-1/VIH-2 EIA**

Se usó un Kit Recombigen VIH-1/VIH-2 EIA. A continuación se describen los trabajos preliminares de dicha prueba:

##### **Procedimiento.**

1. Llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente y chequear que la incubadora este a  $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
2. Determinar el número total de pocitos necesarios para el ensayo. Aparte de el número de muestras se deberá tener un pocito para un blanco, 2 para controles negativos, 3 para controles positivos VIH-1 y 2 para controles positivos VIH-2.
3. Prediluir en tubos de ensayo las muestras y controles con 300 ul de diluyente de muestra más 15 ul de muestra o control. Pipetear 200 ul de la dilución a cada pocito usando un tips para cada muestra y control. **(No agregar ningún reactivo al pocito (A-1)).**
4. Cubrir la placa con la tapa proveida e incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos  $\pm$  5 minutos.
5. Mientras se esta incubando se preparará el conjuado de trabajo.
6. Aspirar los pocitos, lavar 6 veces con 300 ul de la solución de lavado.

7. Agregar 200 ul del conjugado a cada pocito. (No agregar ningún reactivo al pocito (A-1).
8. Cubrir la placa con una nueva tapa e incubar a 37 °C ± 2 °C por 30 minutos ± 1 minutos.
9. Mientras el conjugado se esta incubando se preparará la solución de sustrato. (Nota: Preparar el sustrato durante los últimos 5-10 minutos de la incubación y protegerlo de la luz).
10. Aspirar y lavar como se describe en el paso 6.
11. Agregar 200 ul de la mezcla de sustrato recién preparado en cada pocito *incluyendo el pocito para blanco (A-1)*.
12. Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 minutos.
13. Agregar 50 ul de solución de parada en cada pocito. *incluyendo el A-1.*

Leer dentro de los proximos 60 minutos.

#### **Calculo de resultados.**

Cutoff: Sacar el promedio de los controles positivos y multiplicarlo por 0.32 .

Si la absorbancia de la muestra es menor que el valor del cutoff es no reactiva según el criterio de Recombigen VIH-1/VIH-2 EIA y podrá interpretarse como negativo.

Si la absorbancia de la muestra es mayor o igual que el valor del cutoff se considerará como reactiva (inicialmente reactiva) según el criterio de Recombigen VIH-1/VIH-2 EIA, pero antes de la interpretación, la muestra original deberá repetirse por duplicado y si el resultado es reactivo nuevamente podrá considerarse como positivo.

### 7.3 Diseño de la Investigación:

Se utilizó el método de Kappa ponderado con el cual se evaluó la concordancia entre métodos, Chi-cuadrado el cual evaluó la similitud entre métodos y la sensibilidad de cada uno de los métodos.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

## 8. RESULTADOS

Se analizaron 123 muestras del Banco de sueros del Centro de Orientación Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades de Transmisión Sexual (CODETS), mediante los métodos de Aglutinación de Partículas de Gelatina (PA VIH-1), ELISA Enzygnost Anti-VIH 1/-VIH 2, ELISA Wellcozyme VIH 1 + 2, ELISA Genelavia Mixt, ELISA Abbott VIH-1/VIH-2 EIA Recombinante de Tercera Generación, ELISA Retro-Tek VIH-1 y ELISA Recombigen VIH-1/VIH-2.

Estas muestras, obtenidas en CODETS fueron previamente determinadas por ELISA Enzygnost Anti-VIH 1/-VIH 2 y confirmadas por Western Blot; siendo seleccionadas con el propósito de reunir una cantidad de muestras séricas positivas que fuese estadísticamente representativa para evaluar la sensibilidad de PA y los ELISA contra WB.

De las 123 muestras analizadas por Western Blot se obtuvo un total de 19 indeterminadas, las cuales, en vista que en CODETS se trabaja con códigos y no se lleva un seguimiento específico a cada uno de los pacientes, no fue posible determinar cuántos de éstos volvieron a la realización de la prueba y cuántos no lo hicieron. Entre las muestras analizadas por los diferentes métodos se obtuvo un rango de 103 a 117 muestras positivas y de 6 a 20 negativas (Tabla 8.1).

Los métodos utilizados difieren entre sí en principio antigénico, formato, antígeno, equipo necesario, tiempo requerido, costo y microlitros necesarios para la realización de la prueba; lo cual representa ventajas y



desventajas, no respecto al método, pero sí al ser comparado con otros (Tabla 8.2).

Las muestras de PA y los ELISA presentaron casi el 100 por ciento de sensibilidad bajo las mismas condiciones experimentales cuando fueron comparadas contra WB como método de referencia y estas son: Aglutinación de Partículas de Gelatina (PA VIH-1) 99.65%, ELISA Enzygnost Anti-VIH 1/-VIH 2 99.89%, ELISA Wellcozyme VIH 1 + 2 99.78%, ELISA Genelavia Mixt 99.54%, ELISA Retro-Tek VIH-1 99.07%, ELISA Recombigen VIH-1/VIH-2 99.14% y ELISA Abbott VIH-1/VIH-2 EIA Recombinante de Tercera Generación 98.50%; mostrando la mayor de las sensibilidades el ELISA Enzygnost Anti-VIH 1/-VIH 2, Aglutinación de Partículas de Gelatina (PA VIH-1), y ELISA Wellcozyme VIH 1 + 2, los métodos restantes presentan una sensibilidad ligeramente inferior pero no significativa y al ser analizadas por Kappa (K) ponderada se determinó que no existe acuerdo significativo entre ninguno de los métodos en relación con el Western Blot, siendo  $K= 0.15$ ; al ser analizadas por Chi-cuadrado, todos los métodos mostraron similitud entre sí a excepción, del método de Abbott que es el único con una diferencia bastante significativa a todos los demás métodos, siendo  $P= 0.0011$ .

La mayoría de las pruebas utilizadas para la detección de anticuerpos anti-VIH están clasificadas como indirectas, (Enzygnost, Genelavia Mixt y Retrotec), (Fig. 2), donde el suero del paciente se agrega a la fase sólida que contiene el antígeno y se realiza una primera incubación durante un periodo específico de tiempo y una temperatura particular. El ELISA indirecto produce más color a medida que la

concentración del anticuerpo desconocido aumenta en la muestra, posteriormente las fases de lavado remueven el material no adherido. Los ELISA competitivos o de captación de antígenos (Abbott VIH, Wellcozyme y Recombigen), difieren en que el anticuerpo anti-VIH de la muestra compite con el conjugado (que es un anticuerpo también dirigido contra el antígeno del VIH) para ocupar sitios reactivos en el antígeno fijado (Fig. 3). La cantidad de anticuerpos desconocidos en la muestra analizada es inversamente proporcional a la cantidad de coloración que aparezca. Este tipo de prueba requiere menos tiempo total de ensayo dado que hay menos pasos (el conjugado y la muestra se agregan juntos).

Las pruebas de ELISA de captura del antígeno pueden ser de tipo indirecto o competitivo y sólo difiere en la etapa inicial de fijación del antígeno en la fase sólida (Fig. 4).

Estas pruebas independientemente del principio, pueden ser de primera generación, las cuales usan antígenos obtenidos de cultivos de células infectadas, (aglutinación de partículas de gelatina), de segunda generación que utilizan proteínas virales sintéticas producidas por métodos de recombinación de ADN y de tercera generación que permiten la detección simultánea de anticuerpos IgG e IgM, anti VIH-1 y anti VIH-2.

La mayoría de éstos ELISA usan antígenos del VIH que se fijan en una fase sólida (soporte), junto con un conjugado y un sustrato. Los conjugados son anticuerpos dirigidos ya sea contra un anticuerpo humano (en las pruebas indirectas) o contra un antígeno del VIH en el soporte sólido (en las

pruebas competitivas). En ambos casos, éstos anticuerpos se unen (conjugados) a una enzima; siendo estas enzimas por lo general fosfatasa alcalina o peroxidasa.

Respecto a la prueba de aglutinación, se basa en lisados virales (es decir, los antígenos utilizados en la prueba se preparan de viriones del VIH enteros e intactos). Estos lisados pueden contener varios contaminantes derivados de las células hospederas en las que se propagan los viriones. Estos contaminantes pueden introducir componentes no deseados en el sistema de ensayo y a veces pueden conducir a resultados biológicos falsos positivos. Estas pruebas usan comúnmente como agentes portadores, hematíes, partículas de látex, partículas de gelatina y microesferas.

En el método de aglutinación, las partículas cubiertas de antígenos y los anticuerpos forman una red a medida que los anticuerpos de la muestra reaccionan en el sistema. Esta reacción da lugar a la aglutinación de las partículas (Fig. 5).

En la actualidad no hay ninguna prueba que supere a las otras. Cada laboratorio debe decidir qué prueba adopta de acuerdo a sus necesidades y la elección de una prueba no deberá hacerse a partir de la publicidad del fabricante, ni a partir de los estudios de otros. Las propagandas y los estudios deberán utilizarse sólo como guía para la selección, pero la adopción deberá hacerse sobre la base del desempeño de la prueba en el propio laboratorio, si es posible (calidad del agua destilada, las temperaturas, las presiones, la instrumentación y la técnica del laboratorio).

En la selección de una prueba hay una gran variedad de factores a considerar: 1. Facilidad del procedimiento 2. Trabajo preparatorio requerido 3. Equipo especial y reactivos requeridos pero no proporcionados 4. Tiempo de vida/temperatura de almacenamiento/estabilidad 5. Número de pasos y temperaturas de incubación 6. Volumen del paquete/número de pruebas 7. Tiempo requerido para procesar un lote de sueros 8. Costo por prueba 9. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

Los algoritmos de las pruebas son las siguientes:

- 1.- Utilizar primero Aglutinación de Partículas de Gelatina o un ELISA y repetirse por duplicado todas las muestras inicialmente reactivas, lo cual es una medida para asegurarse que no habido error técnico (Estrategia I).
- 2.- Para que la muestra sea considerada como verdaderamente positiva, debe ser reactiva tanto por el primer método realizado como el segundo, el cual deberá ser de un principio antigénico distinto (Estrategia II)
- 3.- La ultima estrategia (Estrategia III) es el utilizar una tercer prueba diferente en principio antigénico a las primera dos utilizadas, siendo considerada como positiva toda muestra que sea reactiva por lo menos dos de las tres pruebas utilizadas (Tabla 8.3).

8.2 Tabla comparativa de los diferentes métodos para el tamizaje de Anticuerpos Anti-VIH.

PRUEBA	FABRICANTE	PRINCIPIO	FORMATO	ANTIGENO	SUMINISTROS O EQUIPO ADICIONAL NECESARIO	TIEMPO NECESARIO (Horas)	COSTO POR PRUEBA ( Q. )	MICRO-LITROS NECESARIOS
Enzygnost Anti-HIV1/-HIV 2	Química Hoechst, S.A	ELISA Indirecto	Placa de micro-titulación	Péptidos sintéticos	Lector de ELISA Micropipetas Incubadora Dispositivo de lavado	2 1/2	9.88	50
HIV-1/HIV2 de tercera generación.	Abbott Laboratorios S.A.	ELISA, Recombinante	Esferas de poli-estireno	Proteínas virales	IDEM	1 1/2	13.50	150
Genelavia Mixt	Comercial Selecta.	ELISA Indirecto	Placa de micro-titulación	Proteína recombinante	IDEM	2.00	15.00	20
Serodia HIV	Bayer de Guatemala, S.A.	Aglutinación de partículas de gelatina	Placa de micro-titulación	Lisado viral	Micopipeta	2.00	10.22	25
Wellcozyme HIV 1 + 2	Labtronic Ltda.	ELISA Recombinante	Placa de micro-titulación	Proteína recombinante	Lector de ELISA Micropipetas Incubadora Dispositivo de lavado	1.45	9.95	25
Retrotec	Comercial Selecta	ELISA Indirecto	Placa de micro-titulación	Lisado viral	Lector de ELISA Micropipetas Incubadora Dispositivo de lavado	2 1/2	19.00	15
Recombigen	Arquisa, S.A.	ELISA Recombinante	Placa de micro-titulación	Péptido sintético	Lector de ELISA Micropipetas Incubadora Dispositivo de lavado	2.00	10.77	15

8.3 Tabla de estrategias a utilizarse.

Estrategia de detección	Primera Prueba	Segunda prueba	Tercera prueba
I	Serodia-VIH* Enzygnost 1+2 Genelavia Mixt Wellcozyme 1+2 Abbott EIA Re-combinante 1+2 RetroTek-VIH* Recombigen 1+2		
II	Serodia-VIH Enzygnost 1+2 Genelavia Mixt Wellcozyme 1+2 Abbott EIA Re-combinante 1+2 RetroTek-VIH Recombigen 1+2	Enzygnost 1+2 Serodia-VIH Genelavia Mixt Wellcozyme 1+2	
III	Serodia-VIH Enzygnost 1+2 Genelavia Mixt Wellcozyme 1+2 Abbott EIA Re-combinante 1+2 RetroTek-VIH Recombigen 1+2	Enzygnost 1+2 Serodia-VIH Genelavia Mixt Wellcozyme 1+2	Serodia-VIH Enzygnost 1+2 Wellcozyme 1+2

Nota: En las estrategias II y III, cada prueba sólo se puede emplear una vez.

\* Detecta anticuerpos contra VIH-1 solamente.

## 9. DISCUSION

El hecho que tanto los ELISA como PA hayan presentado tan alta sensibilidad, no significa que sean métodos infalibles en la detección de anticuerpos anti-VIH, ya que tanto a PA como a los ELISA se les atribuye una sensibilidad próximas al 100 por ciento. Sin embargo, este estudio pretende afirmar que estas pruebas pueden ser usadas como confirmatorias en sustitución de los métodos de referencia como Western Blot, Radioinmunoprecipitación e Inmunofluorescencia Indirecta.

En vista de que toma tiempo la seroconversión después de la infección primaria, hay indudablemente personas infectadas con pruebas de ELISA negativas. Se ha estimado que la frecuencia con que ésto ocurre en la población de donadores de sangre es de 1:38,461 casos, aproximadamente (44).

Burke et al, en un estudio realizado con 2,707 muestras de suero, determinó una sensibilidad de 99.9 por ciento con una simple determinación de tecnología de ADN recombinante a partir del gen env del virus. Aunque éste y otros estudios evidencian que las pruebas de ELISA disminuyen considerablemente las reacciones inespecíficas, es imprescindible realizar una segunda y tercera prueba cuyos principios antigénicos sean distintos, para confirmar así un primer resultado positivo, con lo cual se tendrá una completa certeza de diagnóstico (49).

Los ensayos más rápidos se basan en hemaglutinación, aglutinación de partículas o una forma de inmunobloting. En

estudios realizados en varias poblaciones diferentes, analizadas con este tipo de metodologías han sido reportadas sensibilidades de 99.3 - 99.7 por ciento (67); PA o cualquier otro ELISA es una excelente prueba para fines de tamizaje, o en su caso confirmatoria si es utilizada luego de obtener un primer, segundo o tercer resultado positivo por cualquier otro método, no obstante, es importante mencionar que cualquiera de estas pruebas son susceptibles a falsos positivos si la realizan operadores sin experiencia (49).

En general, las pruebas ELISA son fáciles de realizar, se prestan para examinar muchas muestras, no requieren uso de sustancias radioactivas y son muy sensibles, sin embargo, cualquier desviación en los tiempos de incubación, temperatura o volúmenes, puede provocar cambios dramáticos en los resultados de las pruebas. Las fases de lavado deben cumplirse con precisión y los reactivos deben prepararse exactamente como se indica. Los conjugados deben ser mezclados perfectamente pero con suavidad para no alterar la enzima. Los sustratos deben prepararse inmediatamente antes de usarlos y deben conservarse en la oscuridad antes de agregarlos al sistema de prueba.

En los Kits comerciales de ELISA, el pH del buffer es un factor que está completamente bajo control; además con un baño de María termoestable, la temperatura no constituye ningún problema, sin embargo, los lavados deben realizarse cuidadosamente, evitando que puedan quedar moléculas del conjugado que produzcan falsamente un resultado positivo (45,47).



En un estudio de Yoshida et al., se evaluó un suero positivo de anticuerpos anti-VIH fraccionándolo por cromatografía líquida de alta resolución para determinar las fracciones correspondientes a anticuerpos de clase IgG e IgM. El resultado fue que los anticuerpos IgM fueron detectados tan bien como los anticuerpos IgG. Esto representa una ventaja frente a algunos ELISA que detectan únicamente anticuerpos IgG (44-48,65).

Un problema potencial y serio en las pruebas de aglutinación es el fenómeno de las reacciones de prozona, la cual es una inhibición de la aglutinación cuando hay exceso de anticuerpos, impidiendo así la formación de una combinación apropiada (o red). En otras palabras, las concentraciones de antígenos y anticuerpos no son óptimas para permitir que produzca la aglutinación (Fig. 6). De esto puede resultar una reacción falsa negativa (no hay aglutinación) cuando hay una alta cantidad de anticuerpos y sólo pueden detectarse los anticuerpos de la muestra si se diluye ésta y se vuelve a realizar la prueba, es también un factor determinante en la realización de la prueba de PA la agitación, la cual, no debe ser suave ni circular sino más bien un tanto brusca o vibratoria y constante durante dos minutos. Esto quizá promueva el choque entre las partículas de gelatina asegurando la aglutinación en presencia de anticuerpos anti-VIH. Es probable que las partículas de gelatina se rechacen entre sí por efectos de polaridad y que por ello la agitación sea un factor tan crítico y determinante en esta prueba, ya que una agitación muy suave

y en movimientos circulantes puede producir falsos positivos (55).

En estudios realizados en Japón y Estados Unidos sobre sueros teniendo potencial para producir falsos positivos, PA ha sido evaluada en muestras de suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), factor reumatoideo positivos, muestras con anticuerpos anti-HLA, mujeres embarazadas, pacientes politransfundidos, pacientes con anticuerpos anti-tiroglobulina y pacientes con anticuerpos anti-microsomales, revelando resultados inequívocamente negativos en todos los casos. En ese sentido, tendría relevancia realizar una investigación al respecto, tanto en pacientes con enfermedades autoinmunes, así como también, en una población afecta a enfermedades tropicales como en la población guatemalteca en algunas regiones del país (47,54,65).

Una característica importante de PA es la capacidad de detección de anticuerpos a títulos muy altos. Sin embargo, a pesar de la alta sensibilidad, la especificidad de la prueba puede verse afectada, pues eventualmente, el método de PA puede producir resultados falsos positivos en pacientes politransfundidos que desarrollen anticuerpos anti-linfocíticos, ya que el antígeno de PA es un lisado del virus crudo obtenido a partir de cultivos de linfocitos infectados y en el proceso de gemación, la membrana del virus arrastra consigo antígenos linfocíticos que pueden reaccionar con los anticuerpos de éstos pacientes (60,61,65,66).

En general, de los métodos evaluados, se sugiere la realización de aglutinación de partículas de gelatina como

primer prueba de tamizaje, ya que, esta es una prueba de bajo costo, no requiere equipo adicional y presenta la ventaja ante los demás métodos que al cometer un error en determinada prueba, se repite solamente esta, no como en los ELISA que se puede llegar a perder el resto de los pocitos; posteriormente de la realización de PA utilizar una segunda y/o tercer prueba para confirmar un primer resultado reactivo.

En vista de los costos de las pruebas de tamizaje muy inferiores al WB, presenta gran ventaja el realizar incluso tres pruebas de tamizaje de diferente principio antigénico, que pueden llegar a sumar un máximo de Q 60.00 y no el WB cuyo precio en una sola prueba que puede llegar a tener un costo mínimo de Q 400.00, no obstante, la determinación de realizar WB es imprescindible para fines epidemiológicos, en donde el factor económico no es el factor determinante.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 En virtud de su sensibilidad y simplicidad la técnica, de PA es muy apropiada y útil para el tamizaje en masa de grandes cantidades de muestras en países subdesarrollados de escasos recursos, ya que, es un ensayo rápido que no necesita de instrumental ni equipo especial.
- 10.2 Los ELISA y PA tienen muy alta sensibilidad comparables en ambos casos a la sensibilidad de (WB). No obstante, a pesar que ambas son excelentes alternativas, son útiles para fines de tamizaje exclusivamente si estas son utilizadas como única prueba.
- 10.3 El utilizar las estrategias recomendadas por la OMS da confiabilidad al dar un diagnóstico positivo de anticuerpos anti-VIH, siempre y cuando éstas sean utilizadas de la manera adecuada; refiriéndose con ésto, que toda prueba positiva se repita primero y por duplicado por el método inicial y luego de obtener el resultado también positivo, este mismo suero se someta a una segunda y/o tercera prueba, la(s) cual(es) tenga(n) un principio antigénico diferente a las otras.

10.4 El someter un suero a dos o tres pruebas de tamizaje cuyo principio antigénico sea diferente, representa un costo mas bajo, que la utilización de la estrategia tradicional de realización de una prueba de tamizaje junto con la realización del Western Blot.

10.5 De todas las técnicas realizadas el ELISA VIH-1/-VIH-2 de tercera generación de Abbott Laboratorios presentó la menor de las sensibilidades, mostró diferencia significativa en comparación a los otros métodos y es la que toma el menor tiempo en su realización (1 1/2 hrs.), las pruebas Retrotec y Recombigen la menor cantidad de muestra (15 ul). Enzygnost la mayor de las sensibilidades y menor costo por prueba (Q 9.85) y Serodia la única que no utiliza equipo alguno para su realización.

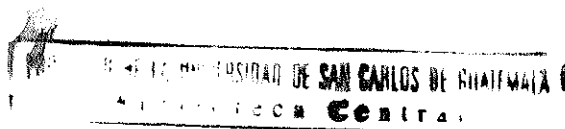
PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
BIBLIOTECA CENTRAL

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1 A pesar de los hallazgos del presente estudio, no puede ser excluida completamente, la posibilidad de reacciones inespecíficas de las pruebas de PA y ELISA en la detección de anticuerpos anti-VIH. Por lo tanto, se recomienda el análisis confirmatorio por Western Blot, IFI, RIPA u otro método de referencia en muestras positivas por ELISA o aglutinación de partículas de gelatina (PA), si no se cuenta con la posibilidad de realizar una o dos pruebas más de tamizaje, cuyo principio antigénico sea diferente al primero.
- 11.2 Evaluar la prueba de PA en sueros con potencial de producir reacciones inespecíficas, principalmente en pacientes politransfundidos, mujeres multíparas, pacientes con desórdenes inmunológicos y/o hematológicos (Ej. factor antinuclear positivo, púrpura trombocitopénica, etc.), y en pacientes con historia previa de enfermedades tropicales (Ej. malaria, dengue, chagas, etc.) para determinar el grado de sensibilidad de PA en éstas muestras.

## 12. REFERENCIAS

1. Toledo JR. SIDA Actualización de un problema contemporáneo. Guatemala: AGAYC, 1992;103:1-15.
2. Quezada E, et al, SIDA Infección-enfermedad por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. La Habana: Cuba Editorial Científico Técnica, 1987;310:24-35.
3. Essex M, Kanld JP, The Origins of the AIDS virus, Scientific Amercian Doc. Tec. 1988;44:32-36.
4. Mena LE. Comparación de los métodos ELISA y Aglutinación de partículas de gelatina para la detección de anticuerpos contra el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) y prevalencia de la infección en una población de prostitutas de Zacapa y Puerto Barrios. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, ( tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1991;94:25-40.
5. Hirschmann A, et al, Study on Sexual Conduct of Guatemala Army. Peronnel. Guatemala: AGPCS, 1991;63: 50-55.
6. Manual de Apoyo Práctico. Guatemala: Shanti, 1994;94:45-54.
7. Coyoy JO. Detección de anticuerpos contra el VIH en una población de prostitutas controladas por servicios de salud en Coatepeque, Quetzaltenango. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1989;50:32-45.



8. Levy JA, et al, Infection by the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1985;ii:65-69.
9. González MA. Prevalencia de anticuerpos anti-VIH en una población de prostitutas clínicamente no controladas por la Dirección General de Servicios de Salud. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, ( tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1989: 90p.
10. Gallo RC, Wong-Staal F. Human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) as the cause of the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Int Med 1985;335:395-403.
11. Lenette EH, et al, Manual of Clinical Microbiology 4 ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 1985; XVI + 1149p.
12. Hardy DB. Cultural practices contributing to the transmission of human immunodeficiency virus in Africa. Rev Inf Dis 1987; 335:363-368
13. Sebatier R. AIDS in the developing world. Int Fam Plan Persp 1987; 103p.
14. Surgenor D. The patient's blood is the safest blood. New Eng J Med 1987;544:343-347.
15. Eyster ME, et al, Development and early natural history of HTLV-III antibodies in personwith hemophilia. JAMA 1985;328::548-550.
16. Selgmann J, Hager M. A new worry for health-care-workers: the treat of infection through contact with AIDS-contaminated blood. Newsweek 1987;456:323-326.



17. Maayan S. et al, Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in an economically disavantage population. Arch Int Med 1985;335:181-183.
18. Groopman JE, Mayer KH, Sarngadharan MG. et al, Seroepidemiology of human T-lymphotropic virus type III among homosexual men whith the acquired immunodeficiency syndrome or generalized lymphadenopathy and among asymptomatic controls in Boston. Annals of Inter Med 1985;103:689-693.
19. Koerper MA, Kaminsky LS, Levy JA. Differential prevalence of antibody to AIDS-associated retrovirus in haemophiliacs treated with factor VIII concentrate versus cryoprecipitate: revovery of infectious virus. Lancet 1985;328:539-542.
20. Essex M. et al, Antigens of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus. Ann Int Med 1985;106:568-581.
21. Ledger WA. AIDS and the obstetrician/gynecologist. Patient Care 1987;17:659-663.
22. Redfiel RR. et al, Frequent transmission of HTLV-III among spouses of patients with AIDS-related complex and AIDS. JAMA 1985;No. 6.
23. Scott GB. et al, Mother of infants with the acquired immunodeficiency syndrome: evidence for both symptomatic and asymptomatic carries. JAMA 1985;239:573-579.
24. Zulaica D. et al, Transmisión heterosexual del retrovirus. Med Clin (Barc) 1987;239:620-626.

25. Clotet B. Transmisión heterosexual del virus de la inmunodeficiencia humana. Med Clin (Barc) 1987;103: 657-662.
26. Piot P. et al, Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. Lancet 1984;257:1357-1363.
27. CDC. Heterosexual transmission of human T-lymphotropic virus type-III/lymphadenopathy-associated virus. MMWR 1985; 563p.
28. Harris C. et al, Immunodeficiency in female sexual partners of men with the acquired immunodeficiency syndrome. New Eng J Med 1986;9:847-960.
29. Whittington WL. et al, the prevalence of HTLV-II/LAV antibodies in heterosexuals (letter). JAMA 1986;ii:1018
30. Mann JM. et al, Prevalence of HTLV-III/LAV among spouses of patients with AIDS-related complex and AIDS. JAMA 1985;106:380-382.
31. Redfield RR. et al, Female-to-male transmission of HTLV-III (letter). JAMA 1986;71:1-7.
32. Mc Fadden T, Jason JM, Feorino P. HTLV-III/LAV-seronegative, virus-negative sexual partners and household contacts of hemophiliacs (letter). JAMA 1986;148:1299-1301.
33. CDC. Update: acquired immunodeficiency syndrome—United States. MMWR 1986;239:585-592.
34. Pomerantz RJ. et al, Human immunodeficiency virus (HIV) infection of the uterine cervix. Ann Int Med 1988;313:493-497.

35. Stewart GJ. et al, Transmission of human T-cell lymphotropic virus type-III (HTLV-III) by artificial insemination by donor. Lancet 1985;108:321-327.
36. Coates RA. et al, Risk factors for HIV infection in male sexual contacts of men with AIDS or an AIDS-related condition. Am J Epidemiol 1988;ii:65-69.
37. Padian Ns. Heterosexual transmission of acquired immunodeficiency syndrome; international perspectives and national projections. Rev Infc Dis 1987;318:525-530.
38. Conant M. et al, Condoms prevent transmission of AIDS-associated retrovirus (letter). JAMA 1986;8:6-12.
39. Goedert JJ. et al, Determinants of Retrovirus (HTLV-III) antibody and immunodeficiency conditions in homosexual men. Lancet 1987;15:47-64.
40. Bayley A. Agressive Kaposi's sarcoma in Zambia. Lancet 1984;157:1-5.
41. Fauci AF. Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical, immunologic, and therapeutic considerations. Ann Intern Med 1986;157:225-229.
42. Estrada RM. Sistema de clasificación para la infección por VIH y definición de caso para SIDA entre adolescentes y adultos (CDC) (Rev Med) No. 2 Vol.3, 1993 (p35-42)
43. Mmudgil T. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infecte persons Copyright 1989;530:1621-1625.

44. Schochetman G. et al, Serodiagnosis of infection with the AIDS virus and other human retroviruses. Ann Rev Microbiol 1989;43:629-659.
45. Lee MH. et al, Comparable sensitivities for detection of human immunodeficiency virus by sensitive reverse transcriptase and antigen capture enzymelinked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1988;26:552-556.
46. Population reports. Population information program, the Johns Hopking University, Maryland USA 1987; No. 6
47. Yoshida T. et al, Evaluation of passive particle agglutination test for antibody to human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol 1987;25:1433-1473.
48. Yoshida T. Yamamoto N. Detection of AIDS virus (HIV) antibody thorough agglutination. Immunohaematology 1987;9:75-79.
49. Reesink HW. et al, Evaluation of six enzyme immunoassays for antibody against human immunodeficiency virus. Lancet 1986;ii:483-486.
50. Foucault C. et al, Double HIV-1 and HIV-2 seropositivity among blood donors. Lancet 1987; iii:165-166.
51. Blomerg J. Klasse PJ. Quantification of immunoglobulin on electrophoretic immunoblot strips as a tool for human immunodeficiency virus serodiagnosis. J Clin Microbiol 1988;26:111-115.

52. Wittek AE. et al, Detection of human immunodeficiency virus core protein in plasma by enzyme immunoassay. Ann Intern Med 1987;107:286-292.
53. McCabe CA. et al, Indirect immunofluorescence for the detection of antibody to human immunodeficiency virus type 1. Lab Med 1990;21:103-104.
54. Kobayashi S. Yamamoto N. Evaluation of a kit utilizing particle agglutination for the detection of antibodies to HIV (the AIDS virus). Clin Virol 1986; 458p.
55. Burke DS. et al, Diagnosis of human immunodeficiency virus infection by immunoassay using a molecularly cloned expressed virus envelope polypeptide. Ann Intern Med 1987;106:671-676.
56. Garcia F. Síndrome de la soledad, (SIDA y Soc.) 1989; Num.148, Vol 11: (p.26-29)
57. Taracena AM. El medio ambiente y el VIH (ABPCS) 1993 No. 2 (p.7)
58. Proyecto SIDA. El Médico frente al SIDA. Guatemala: Talleres Gráficos Estrada, 1990. 161p.
59. Mitchell SW. Field evaluation of alternative HIV testing strategy with a rapid immunobinding assay and an agglutination assay, The lancet Doc. Tec. 1991; 308:252-255.
60. De Ferre. et al, Comparison of six serological assay for human immunodeficiency virus antibody detection in developing countries. J Clin Microbiol 1988;4:29-32.

61. Davey RT. Laboratory Methods in the diagnosis and prognostic Staging of infection with HumanImmunodeficiency virus type 1 JAMA Doc. Tec. 1990 100:93-106.
62. Wong-Staal F. The Molecular Biology of the AIDS virus; Scientific American 198874:65-69.
63. Vigilancia Epidemiologica del SIDA en las Americas, Organización Panamericana de la Salud, OPS/OMS programa Mundial sobre el SIDA/Américas 1991
64. Herrera MI. New Test. Simposium International de réflexion sur le SIDA. Paris, oct 22-23, 1987;280: 95-99.
65. Constantine NT. Pruebas para la detección del VIH y control de Calidad, Copyrigh 1991;17965-68.
66. Arroyo G. Informe técnico del curso/taller sobre técnicas de laboratorio para el diagnóstico de SIDA y Enfermedades de Transmisión Sexual, APROFAM (Doc Tec) 1991;26:2-9.

13. ANEXOS

CUADRO No. 1

PROCEDIMIENTO DE LA TECNICA PA

POZO No.	1.	2.	3.
Diluyente de suero (ul)	75	25	25
Muestra de suero (ul)	25	25	25
Dilución del suero	1:4	1:8	1:16
Partículas no sensibilizadas (ul)		25	
Partículas sensibilizadas (ul)			25
Dilución final		1:16	1:32
Mezclar usando el vibrador automático		Cubrir la placa e incubarla durante dos horas	
I N T E R P R E T A R			

*Serodia - VIH (Fujirebio Inc.), Japón, 1989.4*



CUADRO No. 2

CRITERIOS PARA LA INTERPRETACION DE LOS PATRONES DE  
AGLUTINACION DE PA

PATRON	LECTURA	INTERPRETACION
Particulas aerregadas en forma de un botón en la parte central del pozo con un contorno liso y redondeado.	( - )	NEEATIVO
Las partículas forman un anillo completo con un borde externo liso y redondeado.	( ± ) *	NEGATIVO
Anillo grande bien definido con un borde externo áspero y aglutinación periférica.	( + )	POSITIVO
Aglutinación membranosa de las partículas, las cuales aparecen cubriendo uniformemente el fondo del pozo.	( ++ )	POSITIVO

\* Aquellas muestras que den resultado de lectura ( ± ) son interpretadas como negativas

*Serodia - VIH (Fujirebio Inc.), Japón, 1989.4*

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

CUADRO 3

*1993 Sistema de clasificación revisado para la infección por el VIH y definición de caso sobre SIDA para adolescentes y adultos [Tomado de: Estrada RM, (CDC) (Rev Med) No. 2 Vol.3, 1993]*

CATEGORIA CLINICA			
	A	B	C
Categorías Cel. T CD4	Asintomáticos VIH Agudo o LGP*	Sintomáticos No condicionan A o C	Indicadores de SIDA
(1) +/- 500/u1	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>
(2) 200-499/u1	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>
(3) Menos de 200/u1 (recuento de cél. T indicador de SIDA)	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>

\* LGP= Linfadenopatía generalizada persistente

FIGURA No. 1 Representación esquemática del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), el genoma y los productos codificados por éste [tomado de: Groopman Je (9), Essex N (13)].

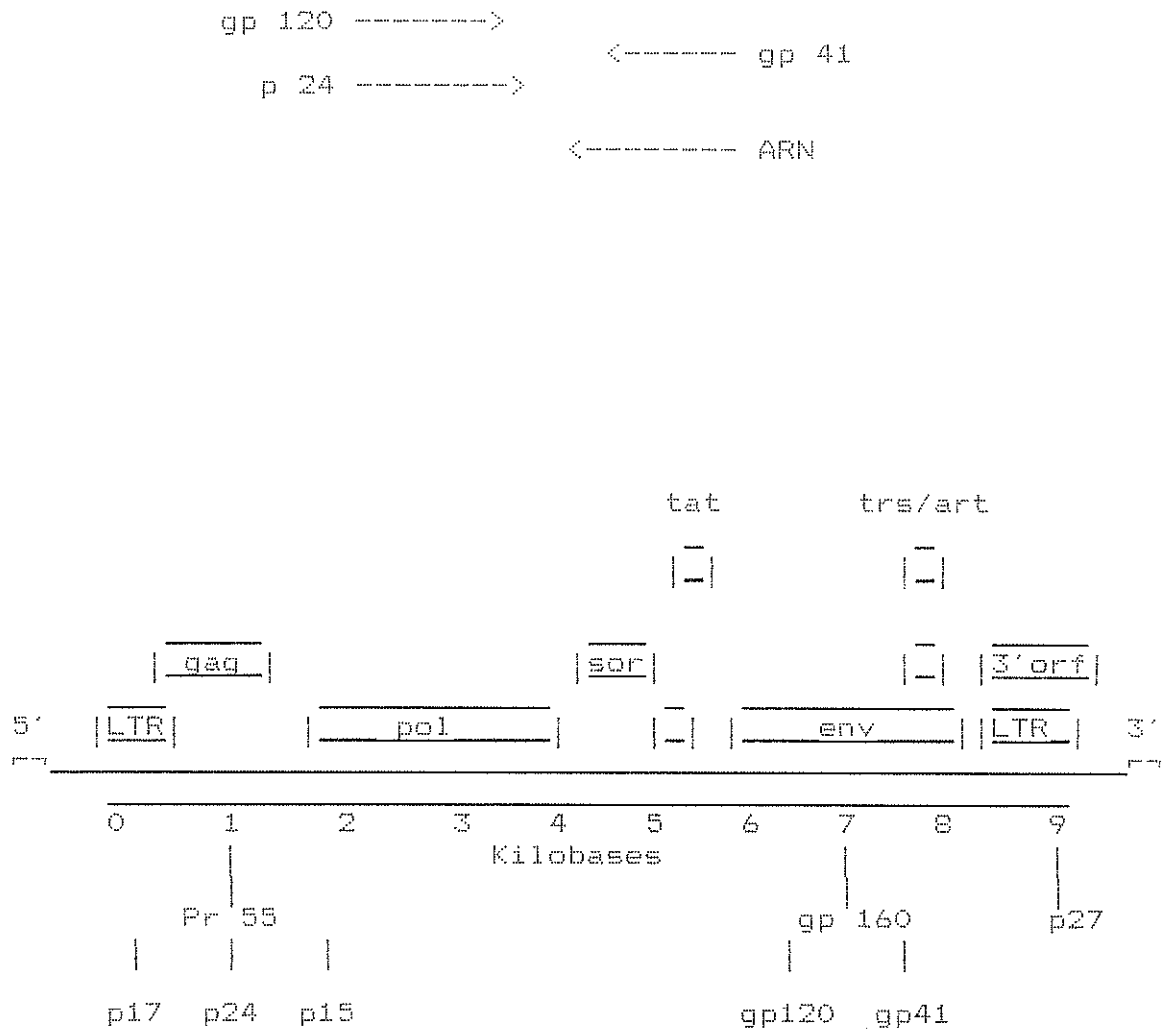


FIGURA No. 2 Principio de la Prueba ELISA Indirecta. [tomado de: Niel DC., Pruebas para La Detección y Control de Calidad, 1991].

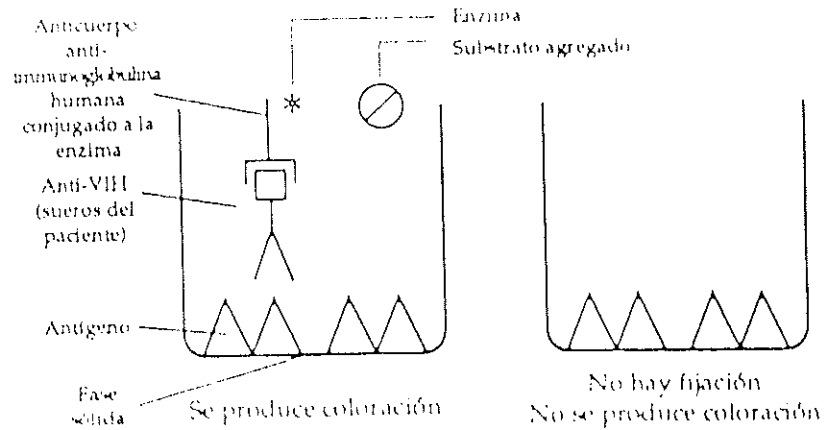


FIGURA No. 3 Principio de la Prueba ELISA Competitiva. [tomado de: Niel DC., Pruebas para La Detección y Control de Calidad, 1991].

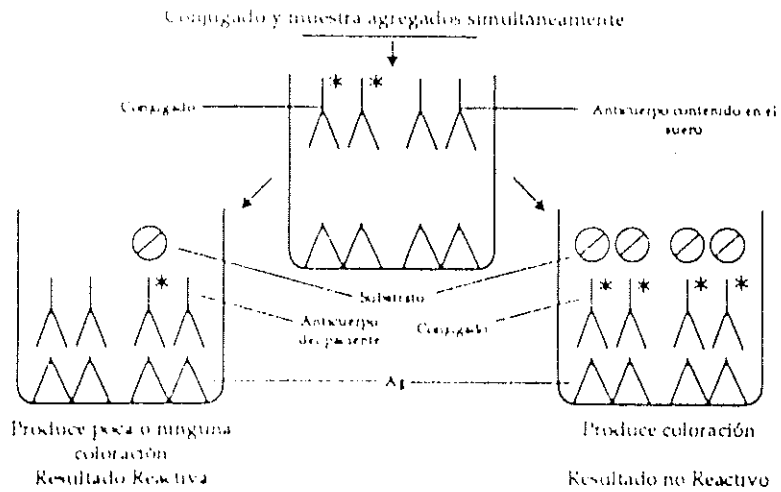


FIGURA No. 4 Principio de la Prueba ELISA de Captura del antígeno. [tomado de: Niel C., Pruebas para La Detección y Control de Calidad, 1991].

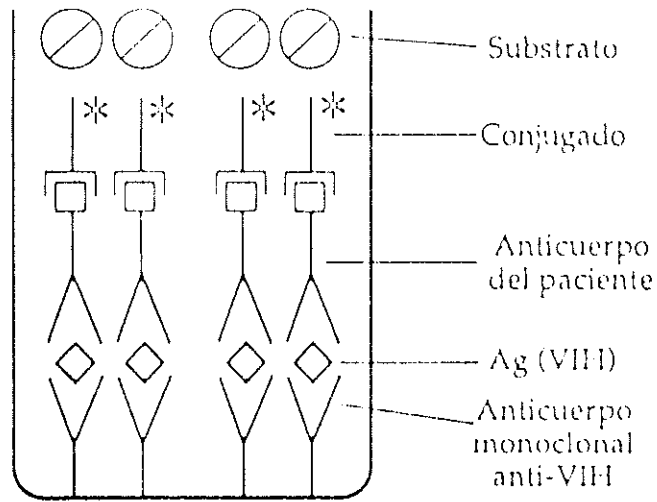


FIGURA No. 5 Formación de la Red y Aglutinación. [tomado de: Niel DC., Pruebas para La Detección y Control de Calidad, 1991].

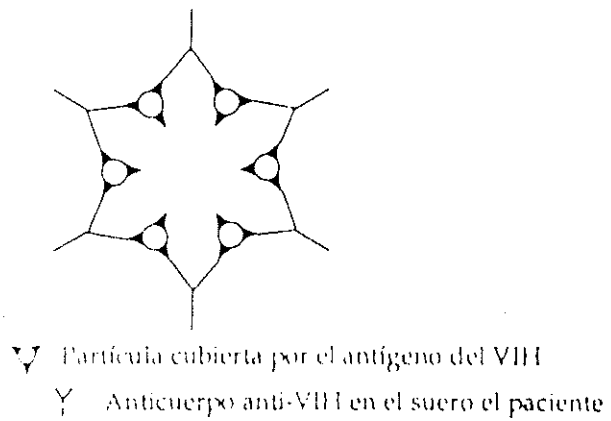
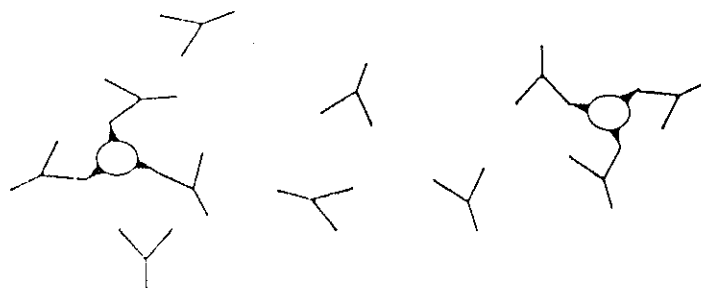


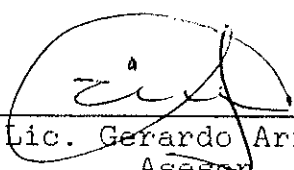
FIGURA No. 6 Ausencia de aglutinación debido a la Prozona (Exceso de anticuerpos). [tomado de: Niel DC., Pruebas para La Detección y Control de Calidad, 1991].





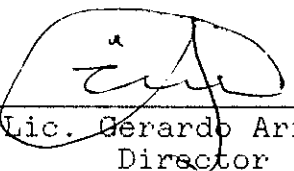
---

Erick Alfonso Castillo Alonzo  
Estudiante



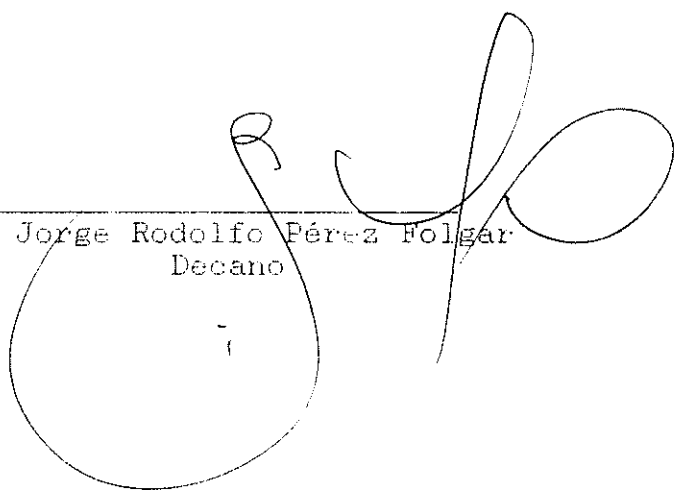
---

Lic. Gerardo Arroyo  
Asesor



---

Lic. Gerardo Arroyo  
Director



---

Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar  
Decano