

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

VALIDACIÓN DE LA PRUEBA VIRONOSTIKA<sup>®</sup> HIV UNI-FORM II AG/AB,  
PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR VIH EN PERSONAS QUE  
ACUDEN A LA CLÍNICA FAMILIAR “LUIS ANGEL GARCÍA”.



FABIOLA KARINA MORALES CASTELLANOS

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, ABRIL 2,005

## INDICE

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
III. Antecedentes.....	5
A. Generalidades del VIH.....	5
1. Patogénesis de la infección por VIH.....	5
2. Vías de transmisión.....	6
3. Evolución clínica de la infección por VIH.....	7
4. Diagnóstico de la infección.....	8
B. Objetivos de las pruebas de detección de ac. anti VIH.....	9
1. Características operacionales de las pruebas de anticuerpos anti VIH.....	10
2. Métodos de detección.....	12
3. Estrategias de diagnóstico serológico de la infección por VIH .....	21
IV. Justificación .....	24
V. Objetivos.....	25
VI. Hipótesis.....	26
VII. Materiales y Métodos.....	27
A. Universo	
B. Muestra	
C. Recursos	
D. Metodología	
VIII. Resultados .....	30
IX. Discusión de Resultados.....	35
X. Conclusiones.....	40
XI. Recomendaciones.....	41
XII. Referencias.....	42
Anexos.....	45

## I. RESUMEN

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) se ha convertido en uno de los principales problemas de salud en el mundo, debido a que la infección con el virus es silenciosa al principio y sólo se hace evidente cuando ya se desarrollan enfermedades por el compromiso del sistema inmune de la persona infectada. Las técnicas más utilizadas para determinar la presencia de el VIH en una persona son con fundamento de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), las que detectan la presencia de anticuerpos producidos por la persona infectada contra el virus.

El objetivo general de este estudio fue validar una prueba con fundamento ELISA que además posee la capacidad de detectar la presencia de el virus cuando aún no se producen anticuerpos por la persona infectada, dado que cuenta con la ventaja de incluir en su campo de detección además de anticuerpos contra VIH 1/ 2, la capacidad de detectar la presencia del antígeno p24, el cual forma parte integral de el virus.

Para realizar la validación se obtuvieron muestras de 302 pacientes hospitalizados o ambulatorios que fueron atendidos en la Clínica Familiar “Luis Angel García”, en el período comprendido entre 2 de Septiembre al 16 de Octubre del año 2,002. A estas muestras se les realizó la prueba para determinación de VIH con tres pruebas diferentes, prueba rápida<sup>1</sup>, ELISA-Ac<sup>2</sup> y ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>.

Los resultados se analizaron con el paquete estadístico Epi Info 6.0. Al comparar la prueba en estudio (ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>) con la que se utilizó como estándar de oro (ELISA-Ac<sup>2</sup>) los resultados fueron los siguientes: sensibilidad relativa de 98.20%, especificidad relativa de 99.60%, Valor Predictivo Positivo relativo 98.20% y Valor Predictivo Negativo Relativo de 99.60%, eficiencia de 0.97.

---

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA AXSYM System HIV ½ gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika® Uniform II Ag/Ab

Con base a lo anterior se recomienda el uso de la prueba con fundamento ELISA- Ag/Ac<sup>3</sup> como complemento para el diagnóstico de la infección por VIH, por ser una prueba sensible y específica, y por acortar el período de ventana que permite el inicio del tratamiento de forma temprana.

## II. INTRODUCCION

Los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2 (VIH-1 y 2) son los agentes etiológicos del síndrome de la inmunodeficiencia humana (SIDA) y enfermedades relacionadas con el mismo. La infección por VIH se desarrolla por lo general en tres etapas, la etapa aguda, que en ocasiones puede pasar inadvertida, la fase de portador asintomático, la cual progresa hacia el SIDA clínico, última etapa de la infección que en el 50% de los individuos infectados se manifiesta dentro de los 10 años después de la seroconversión (1).

La evidencia serológica de una infección por VIH puede observarse analizando los antígenos o anticuerpos del virus en el suero o plasma de individuos sospechosos de infección. Poco después de la infección, el antígeno VIH solo es temporalmente detectable, sin embargo los anticuerpos pueden detectarse virtualmente a lo largo de todo el período de infección, desde el principio o poco después de la fase aguda y continuando hasta la etapa final de SIDA. El uso de ensayos de anticuerpos altamente sensibles es un método establecido para el serodiagnóstico de la infección por VIH y el tamizaje de sangre o productos sanguíneos (2).

Los ensayos de anticuerpos contra el VIH son cada vez más sensibles y se ha reducido el denominado período de ventana, es decir el tiempo que transcurre entre la infección y la detección de anticuerpos VIH. Este período de ventana puede disminuir aún más con la incorporación de la detección del antígeno VIH en dichos ensayos. La detección combinada de anticuerpos y antígenos en un mismo ensayo, da paso a la cuarta generación de ensayos de tamizaje para la detección de VIH (3).

El propósito de este estudio fue validar la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, comparando su funcionamiento con las pruebas que se utilizan de rutina, la prueba rápida<sup>1</sup> y la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup>, para luego implementarla como

---

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA AXSYM System HIV ½ gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika<sup>®</sup> Uniform II Ag/Ab

prueba diagnóstica de la infección VIH y prueba complementaria de la prueba de tamizaje, eliminando la necesidad de una prueba confirmatoria como el Western Blot, lo cual a su vez disminuiría el tiempo de entrega de un resultado positivo o negativo definitivo.

## II. ANTECEDENTES

### A. Generalidades del VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) constituye el prototipo del género *Lentivirus*, perteneciente a la familia *Retroviridae*. El nombre alude al largo período de incubación que transcurre entre la infección y la enfermedad, que puede incluso superar los 10 años (1). El VIH es una partícula viral cuyo diámetro es de 1,000 Å o 1/10000 mm (2). Está constituido por un complejo de proteínas que forman la envoltura viral, y el core o nucleocápside. El core posee cuatro proteínas denominadas p-24, p-17, p-9 y p-7. La envoltura está formada por 2 proteínas gp-120 y gp-40. Tiene además una enzima característica llamada transcriptasa inversa, la cual inicia la replicación del virus en la célula huésped (3).

Ha sido identificado claramente como la causa principal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Existen dos tipos VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es el tipo mundialmente dominante. El VIH-2 es principalmente encontrado en África Occidental pero ha habido casos reportados en África Oriental, Asia y Latinoamérica. Existen por lo menos 10 subtipos genéticos de VIH-1, pero su significado epidemiológico y biológico no es claro hasta ahora (1,4).

La acción patógena del VIH en el individuo infectado, resulta de la interrelación entre múltiples factores que influyen en el ciclo vital del virus en sí y en la respuesta inmune por parte del organismo (1).

#### 1. Patogénesis de la Infección por el VIH

La enfermedad se caracteriza por una profunda inmunodepresión celular causada por la destrucción de los linfocitos CD4 (efecto citopático). Una vez se produce la entrada del virus en el organismo, éste infecta a las células mediante la unión por medio del antígeno gp-120 al receptor de superficie CD4 que se halla principalmente en linfocitos y monocitos/macrófagos (1,5).

Esta destrucción celular es compensada con una producción aumentada de linfocitos CD4 durante varios años, hasta que las reservas se agotan, desembocando finalmente una depleción de estos linfocitos, que origina una inmunodeficiencia adquirida, debido a que estas células coordinan la respuesta inmune del organismo. Los monocitos/macrófagos le sirven al virus como transportadores a diversos lugares del organismo especialmente al sistema nervioso central, riñón hígado y pulmón (1,5).

El evento principal en la progresión de la enfermedad es la replicación viral, mientras que el evento determinante del desarrollo de inmunodeficiencia es la destrucción celular linfocitaria. La replicación viral tiene como característica principal, el ser imperfecta. La transcriptasa reversa, que es la enzima que produce copias del material genético viral, comete un error de copia en cada genoma que lee, de tal manera que a través de múltiples ciclos se generan poblaciones virales semejantes pero a su vez diferentes de sus ancestros. Las variantes virales pueden tener características distintivas como cambiar su afinidad por grupos celulares específicos diseminándose a otras poblaciones diferentes o cambiar su antigenicidad, escapando de la vigilancia y del control del sistema inmune por lo cual resulta tan difícil encontrar una vacuna eficiente contra el virus (1).

## **2. Vías de Transmisión del VIH**

La vía más común para la transmisión es por contacto sexual sin protección con personas infectadas con el VIH, el semen, las secreciones cervicales, vaginales y las úlceras genitales favorecen la transmisión sexual (6).

El VIH también se transmite a través de la sangre, productos sanguíneos (transmisión endovenosa) y órganos o semen donados. Puede ser transmitido también de una madre infectada al feto o infante durante el embarazo o en el parto (transmisión vertical), o cuando se alimenta con leche materna. El utilizar material no esterilizado para perforación de orejas, agujas para tatuajes, jeringas material quirúrgico o dental también es un riesgo para la infección por el VIH (7).

### 3. Evolución Clínica de la Infección por el VIH

La infección por el VIH puede producir una variada gama de manifestaciones clínicas, que pueden ir desde ausencia de síntomas a ligero malestar, hasta desordenes neurológicos y la muerte por enfermedades oportunistas (8). La evolución de la enfermedad se puede clasificar en cuatro fases:

3.1 Fase Aguda: Por lo general es asintomática, pero puede presentar un cuadro parecido a un proceso viral, que se presenta entre la primera y sexta semana de la infección. En este período se pueden presentar fiebres, náuseas, vómitos y diarreas, adenopatía con carácter inflamatorio y pérdida de peso entre otras manifestaciones, que se atribuyen a la intensa reacción inmunológica causada por la replicación viral (8,9).

3.2 Fase Asintomática: Denominada también “fase de portador asintomático”, en este período la persona no presenta síntomas de la infección, pero puede transmitir el virus a través de líquidos y secreciones corporales. El período que transcurre de la infección a los primeros signos y síntomas de SIDA varía dependiendo la calidad de vida que tenga la persona, y presenta una media de 10 años (8,9).

3.3 Fase Sintomática: Esta usualmente se presenta un estadio de linfadenopatía generalizada, caracterizada por la presencia de ganglios linfáticos de más de 1 cm. de diámetro en dos o más localizaciones extrainguinales, que persisten por lo menos tres meses. También se dan sudores nocturnos, pérdida de peso, infección por *Herpes Zoster*, candidiasis orofaríngea, dermatitis seborréica, piel escamosa entre otras (8,10).

3.4 Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida: Es la etapa final de la infección por el VIH, se caracteriza por una severa inmunosupresión que favorece el desarrollo de enfermedades oportunistas, que son la causa principal de mortalidad en las personas infectadas por el VIH (8, 11).

Tabla No. 1  
Enfermedades más comunes en pacientes con SIDA

Enfermedades pulmonares	Neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i> Tuberculosis pulmonar Neumonía recurrente Micosis pulmonar Neumonía intersticial linfoide (12,13)
Enfermedades Gastrointestinales	Problemas esofágicos Diarrea por coccidios Diarrea bacteriana (12)
Anormalidades del sistema nervioso central	Toxoplasmosis Encefalopatía por VIH Demencia e Infección sífilica (12,14)
Problemas oftálmicos y bucofaríngeos	Microangiopatía Retinitis por Citomegalovirus Candidiasis bucofaríngea (12,13)

#### 4. Diagnóstico de la Infección por el VIH

El diagnóstico de la infección por VIH-1 se establece de modo definitivo por métodos de laboratorio, ya que las manifestaciones clínicas, aunque sugerentes, son inespecíficas en cualquier estadio de la enfermedad (2, 15).

Para entender las peculiaridades del diagnóstico es preciso conocer la evolución de los marcadores serológicos y de la antigemia. Estos pueden seguir distintos patrones:

\* Patrón 1: Es el habitual. Tras la infección existe un período llamado período de ventana, (que puede ser de 2 a 6 semanas dependiendo de la vía de infección), durante el cual únicamente podemos detectar la presencia del propio virus o de sus partículas (el antígeno p24 o el ácido nucleico), ya que el organismo no ha sintetizado anticuerpos (2).

Durante los seis meses siguientes, generalmente entre las dos a seis semanas, se produce la seroconversión y aparecen los anticuerpos contra el virus, inicialmente los de tipo IgM y luego los IgG, que son los que se miden en las pruebas de tamizaje. De forma paralela va descendiendo la viremia (y la antigemia p24), y permanece indetectable hasta estadios muy avanzados de la enfermedad en que vuelve a aumentar, detectándose en el 75% de los pacientes con SIDA. La positividad final del antígeno p24 coincide con la desaparición de los anticuerpos contra el virus, como reflejo del fracaso inmunitario que caracteriza el estadio final de la enfermedad (5).

\* Patrón 2: Se conoce también como de “latencia prolongada”, en este los anticuerpos aparecen después de un período de ventana de años y sin ser detectable el virus. Es frecuente cuando el inóculo inicial de virus es muy reducido (5,6).

\* Patrón 3: O sero-reversión, se ha descrito ocasionalmente en pacientes seropositivos conocidos, que posteriormente presentan una pérdida progresiva de anticuerpos, transformándose en seronegativos (6).

## **B. Objetivos de las Pruebas de Detección de Anticuerpos Anti-VIH**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido de manera clara cuáles son los objetivos de las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH (16). La mayoría de casos o situaciones en la práctica diaria del laboratorio puede ser incluida en uno de los objetivos contemplados en la tabla No. 2.

Tabla No. 2

Objetivos de las pruebas de detección de anticuerpos anti-VIH (16).

- 
- Seguridad biológica (tamizaje de donantes de sangre, órganos, semen, óvulos, etc.).
  - Diagnóstico de la infección por el VIH.
  - Vigilancia seroepidemiológica
  - Investigación.
- 

Los objetivos que se persigan con el diagnóstico van a influir en la elección de la técnica apropiada, en la actitud del profesional de laboratorio ante un resultado y en la estrategia de confirmación. De forma conceptual, se denominan pruebas diagnósticas las que se emplean de forma individualizada en el suero de una persona bajo los principios clínicos del consentimiento informado, y sirven para detectar o descartar la infección por este virus. Cuando las pruebas se aplican en virtud de criterios de seguridad biológica, vigilancia epidemiológica o investigación y el objetivo principal no es el diagnóstico clínico de la infección por el VIH, se denominan pruebas de detección de anticuerpos anti-VIH en sentido estricto (15,16).

Las pruebas habituales de detección de anticuerpos frente al VIH constituyen un primer escalón en el diagnóstico de la infección por este virus y se aplican en la práctica clínica a un gran número de sueros. Así, la sencillez y la posibilidad de automatización son cualidades que deben tenerse en cuenta a la hora de elegir un prueba en particular (16).

### **1. Características Operacionales de las Pruebas de Anticuerpos Anti-VIH**

La sensibilidad y la especificidad son los parámetros más importantes para valorar una prueba y, en el caso de la aplicación clínica de las pruebas VIH, son muy importantes el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) (17).

La sensibilidad de los equipos actuales ha alcanzado límites máximos; es frecuente leer artículos en los que se mencionan sensibilidades de un 99-100% para el conjunto de muestras ensayadas. Conviene señalar, sin embargo, las dificultades de alcanzar una sensibilidad real del 100% en una infección en la que la seroconversión ocurre en un lapso de 2 a 4 semanas en la mayoría de los casos y, a veces, hasta varios meses (período ventana). Cabe recordar a este respecto la posibilidad de encontrar individuos infectados por el VIH que son seronegativos debido a causas orgánicas o defectos inmunes (falsos negativos) (17,18).

Es bien conocido que el incremento de la sensibilidad lleva aparejado un descenso de la especificidad (falsos positivos); aunque las técnicas actuales ofrecen cifras de especificidad en torno al 99%, el aumento espectacular que ha experimentado la demanda analítica posibilita que los resultados falsos positivos sean más frecuentes, a pesar de las mejoras técnicas introducidas en las pruebas primarias de detección de anticuerpos frente al VIH (18).

Otro aspecto importante a la hora de valorar las características operacionales de una prueba diagnóstica para el VIH es la prevalencia de la infección entre la población estudiada. A menor prevalencia, el VPP disminuye o, dicho de otra manera, mayor es la probabilidad de que se produzcan resultados positivos falsos en una población con tasas de infección VIH bajas. En muchos hospitales o laboratorios en los que se realizan las pruebas del VIH el porcentaje de sueros positivos ha descendido en los últimos años hasta 2 y 4 veces respecto a los encontrados hace 12 ó 14 años cuando se inició el diagnóstico de este virus (19).

Las causas de este fenómeno son variadas y cabría citar la mayor sensibilización respecto de la infección por parte de los médicos y personal de salud y la existencia de protocolos específicos de tamizaje serológico en los enfermos renales, hemodializados, exposición accidental, control de la gestante e, incluso, en las pruebas analíticas preoperatorias, estrategia esta última de cuestionable utilidad (19,20).

Todas estas situaciones clínicas han propiciado un aumento sustancial de la demanda analítica de estas pruebas y un descenso en la tasa de positividad total, por lo que el riesgo de tener resultados falsos positivos en el escalón primario del diagnóstico del VIH es más elevado que antes. Por ello, cualquier laboratorio que ponga en marcha este tipo de técnicas deberá contar entre sus procedimientos de laboratorio con una estrategia o estrategias de confirmación (19).

## **2. Métodos de Detección**

Los métodos para la detección del VIH se pueden dividir en dos grupos, los indirectos, que detectan los anticuerpos contra el virus y son los más utilizados y los directos, que detectan el virus en sí o algunos de sus componente (15).

### **a. Métodos Indirectos**

**Métodos de tamizaje:** Las pruebas de detección habituales han experimentado un considerable desarrollo y mejoras desde su desarrollo inicial. Las mejoras se han dado, principalmente, en el antígeno o antígenos utilizados en el ensayo y al principio técnico en el que se fundamentan dichas reacciones (4,7,17). La mayoría de las primeras técnicas utilizaron antígenos virales crudos más o menos purificados, denominados lisados virales.

Estos antígenos contenían gran cantidad de proteínas procedentes del sistema celular en el que se había cultivado el virus. La posibilidad de una reacción inespecífica del suero con algunos de estos componentes constituyó un problema que hizo obligado el empleo de pruebas de confirmación. En la tabla No. 3 aparece la evolución de los antígenos que se han ido incorporando a los equipos de detección de anticuerpos VIH (4,7,17).

Tabla No. 3

Antígenos empleados en las pruebas de detección primaria de anticuerpos frente al VIH (7).

Técnica	Antígeno
ELISA 1ª generación	Lisado viral VIH-1
ELISA 2ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2
ELISA/ELFA 3ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2 y antígeno VIH-1 del grupo O (outlayer o marginal)
EIA/ELFA 4ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2 y VIH-1 "O", y anticuerpos para detectar el antígeno p24.

La evolución de los antígenos incluidos en las pruebas de detección ha permitido, por una parte, incrementar la sensibilidad sin disminuir la especificidad y, por otra, ha hecho posible la detección de anticuerpos frente a tipos y subtipos del VIH que escapaban a los equipos de diagnóstico habituales. A pesar de las mejoras introducidas en los equipos actuales, debe tenerse en cuenta la posibilidad real de encontrar sueros de infectados por subtipos inusuales del VIH, sobre todo en pacientes africanos o en personas con estancias prolongadas en ese continente (7).

#### **i. ELISA:**

Inicialmente se realiza un método de tamizaje, habitualmente un ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay o ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas). Se basa en la detección de anticuerpos producidos por el paciente contra el virus. Es una prueba de bajo costo, relativamente sencilla y posee una sensibilidad y especificidad cercana al 100% con las técnicas de última generación (17).

Entre las pruebas que se encuentran en el mercado se encuentra el HIV 1/2 gO (AxSYM, Abbott), el cual es un ELISA que utiliza antígenos recombinantes de VIH adheridos a una fase sólida para capturar anticuerpos contra el VIH 1,2 presentes en la muestra de los pacientes (17).

El inconveniente de esta prueba es que puede dar lugar a falsos negativos si el paciente se encuentra en el período de ventana o en fases avanzadas de la enfermedad, cuando se han negativizado los anticuerpos por el colapso del sistema inmune (7,17).

## **ii. Pruebas Rápidas:**

Las denominadas pruebas rápidas han experimentado un desarrollo importante; los antígenos que emplean son similares a los ELISA y ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) y el tiempo en el que se puede obtener un resultado oscila entre 5 y 20 minutos. Aunque las características operacionales son inferiores a los ELISA y ELFA, deben tenerse en cuenta para situaciones de urgencia. Combinadas con otras pruebas de detección de anticuerpos constituyen una estrategia que mejora la especificidad de los resultados de forma asequible en términos de costos laborales y de tiempo (4,7,17).

## **iii. Dot-Blot:**

Otra de estas pruebas es la prueba ELISA de membrana (Dot-Blot), en la cual el antígeno del virus está fijado a una membrana de nitrocelulosa al cual se unen los anticuerpos presentes en la muestra del paciente, tiene lectura visual y no necesita de instrumentación (1,5).

## **iv. Aglutinación:**

Existen pruebas basadas en la técnica de aglutinación pasiva que ofrecen ventajas por su sencillez y simplicidad de ejecución, permiten realizar titulaciones de forma sencilla y bajo costo, pero poseen una menor sensibilidad y especificidad. Están especialmente diseñados para países subdesarrollados o situaciones que requieren un diagnóstico urgente. Estas técnicas permiten detectar tanto anticuerpos de la clase IgG como IgM. (5). La dificultad de automatización las hace poco adecuadas para procesar gran número de sueros, estando menos extendidas (16,17).

**v. Inmunocromatografía:**

Una de las pruebas rápidas es la Determine HIV-1/2 (Abbott), la cual es un ensayo inmunocromatográfico para la detección cualitativa de anticuerpos IgG e IgM frente al VIH-1 y 2 (2). La prueba posee tres diferentes antígenos de envoltura: gp41, para la detección de VIH-1; gp36, para detectar VIH-2 y gp41 específica del subtipo O (18).

En la tabla 4 se puede observar el principio de funcionamiento que utilizan algunas de las diferentes pruebas de tamizaje para la detección del VIH.

Tabla No. 4  
Pruebas rápidas para la detección de anticuerpos frente al VIH (16,17).

Técnica	Antígeno
Dot-ELISA 1ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2 en un único spot
Dot-ELISA 2ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1, VIH-2 y VIH-1"O" en "spots" diferenciados para VIH-1 y VIH-2
Látex/Aglutinación pasiva	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1, VIH-2 y VIH-1"O"
Inmunocromatografía capilar	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1, VIH-2 y VIH-1"O"

## **b. Métodos de confirmación**

La trascendencia de la infección por el VIH hace necesaria la confirmación de los resultados positivos obtenidos en las pruebas de detección primaria de anticuerpos; este paso es inexcusable cuando el objetivo de las pruebas es el diagnóstico.

Existen diferentes pruebas de confirmación; entre ellas cabe citar las basadas en la inmunoelectrotransferencia o Western Blot (WB), inmunofluorescencia indirecta (IFI), radioinmunoprecipitación (RIPA) e immunoblot con antígenos recombinantes (LIA) (18).

El más utilizado es el Western Blot (WB) que detecta anticuerpos contra proteínas específicas del VIH. Se considera un resultado positivo aquel que muestre bandas de anticuerpos contra dos de los siguientes antígenos: gp24, gp41 o gp120/160; si sólo reacciona con uno de los antígenos se considera indeterminado, lo que puede ocurrir en situaciones como la fase de seroconversión, en gammapatías monoclonales y enfermedades autoinmunes, en pacientes politransfundidos, en recién nacidos de madres seropositivas o en reactividad cruzada con otros retrovirus (5).

Se dispone de otras pruebas confirmatorias como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), con una sensibilidad y especificidad similares al WB, pero que aporta menos información al no precisar los anticuerpos específicos que detecta (5).

La radioinmunoprecipitación (RIPA) es una técnica compleja y costosa, cuya utilidad principal es ante un WB repetidamente indeterminado, ya que permite determinar seroconversión de forma precoz (1,5).

Las técnicas de IFI y RIPA, se emplean cada vez menos, de tal forma que los resultados del WB son considerados el estándar de confirmación de la presencia de los anticuerpos anti-VIH. Existen distintos criterios de positividad propuestos por organismos o sociedades involucrados en el diagnóstico del VIH (Tabla No. 5). De ellos, el de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el más específico cuando se manejan sueros de diversa procedencia poblacional (18-20).

Tabla No. 5  
Criterios de positividad de la prueba Western-Blot (21,22).

<b>Criterio</b>	<b>Reactividad frente a</b>
OMS	Dos glucoproteínas cualquiera de: gp160, gp120, gp41
Cruz Roja Americana	Una proteína de cada gen estructural (env, pol y gag)
FDA <sup>a</sup>	p24 + p32 + (gp41 o gp120 o gp160)
CRSS <sup>a</sup>	p24 + (gp41 o gp120 o gp160) o p32 + (gp41 o gp120 o gp160)
CDC/ASTPHLD <sup>a</sup>	p24 + (gp41 o gp120 o gp160) o gp41 + (gp120 o gp160)

<sup>a</sup> FDA: Food and Drug Administration; CRSS: Consortium for Retrovirus Serology and Standardization; CDC/ASTPHLD: Centers for Disease Control/Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors

Las pruebas confirmatorias también son de mucha utilidad para descartar resultados falsos positivos, sobre todo cuando éstos se producen en personas sin ningún factor de riesgo como ocurre generalmente. Las causas de los falsos positivos son variadas (Tabla No. 6) y dependen básicamente de dos elementos, la técnica (antígenos y principio técnico empleado) y las condiciones derivadas del paciente (18).

Tabla No. 6

Causas de falsos positivos en las pruebas séricas de detección de anticuerpos anti-VIH  
(18).

---

A. Relativas al suero

- Congelaciones y descongelaciones repetidas
  - Almacenamiento a temperatura subóptima
  - Aspecto lipídico o turbio del suero
  - Contaminación microbiana
  - Sueros tratados con calor ( $\geq 60^{\circ}\text{C}$ )
  - Errores de extracción o identificación
- 

B. Relativas a la presencia de autoanticuerpos

- Personas con anticuerpos anti-HLA-DR4, DQw3
  - Enfermedades reumatoideas
  - Polimiositis
  - Lupus eritematoso
  - Multitrasfundidos
  - Trasplantados renales
  - Multíparas
- 

C. Relativas a otras condiciones

- Hemodializados, fracaso renal crónico
  - Síndrome de Stevens-Johnson
  - Administración previa de inmunoglobulinas
  - Sueros postvacunales (gripe, hepatitis B)
  - Infecciones agudas por virus DNA
  - Enfermedad hepática alcohólica grave
-

### **c. Métodos Directos**

Las pruebas serológicas pueden tener falsos negativos, en determinadas circunstancias, las pruebas directas proporcionan el diagnóstico en estos casos, al evidenciar la presencia del virus (7).

#### **i. Antígeno p24**

Es el método más utilizado, mediante una técnica de ELISA. El antígeno p24 es una proteína estructural del *core* del VIH-1, de 24kd de peso molecular. Aparece en el organismo como consecuencia de la replicación del VIH en el organismo, evidenciando la presencia del mismo (4,8).

Indicaciones para Utilización de ELISA para Detectar Antígeno p24 (23,24):

##### 1. Período de ventana inmunológica.

Cuando existe sospecha de infección precoz en pacientes seronegativos (24).

##### 2. Como marcador de la evolución de la infección.

El apareamiento de antígeno p24 está relacionado con la progresión de la infección a SIDA. El uso combinado de conteo de linfocitos CD4 y antígeno p24 aumentan la eficacia para la determinación de la progresión a SIDA, cuando se compara con el un conteo de linfocitos CD4 por si solo. Los pacientes positivos para antígeno p24 tienen riesgo 8.0 veces mayor de desarrollar SIDA en un período de 12 a 36 meses (23,24).

##### 3. Para el diagnóstico de niños menores de 18 meses.

El diagnóstico de niños nacidos de madres infectadas es difícil debido a la presencia de anticuerpos maternos, que atraviesan la membrana placentaria. La detección del antígeno en un recién nacido confirma la infección y posibilita el tratamiento precoz que disminuye la incidencia de infecciones oportunistas y aumenta la sobrevivencia de pacientes infectados (23).

4. En los casos de serología indeterminada o no concluyente.

La presencia de antígeno en el suero confirma una infección por VIH. Debido a que la sensibilidad de los diferentes exámenes varía en la fase asintomática, un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección (23,24).

#### § Monitorización de terapia antirretroviral.

La antigenemia p24 disminuye con el inicio de la terapia antiviral. Presenta una reducción media del 71 al 82% comparado con la determinación de antígeno p24 inicial. Un tratamiento de la muestra con ácido, promueve la liberación de antígeno secuestrado por el inmunocomplejo (p24-antip24), esto mejora la sensibilidad de este examen en fase asintomática. De esta forma la sensibilidad de una población asintomática que era del 20% aumenta cerca del 50%. La especificidad de este examen es del 100%. El antígeno p24 puede ser cuantificado si se solicita por el médico (24).

Estudios actuales han demostrado que el antígeno p24 desnaturalizado con calor, es equivalente a la realización de una carga viral o recuento de linfocitos CD4, con la ventaja que es mucho mas barato, siendo posible su utilización principalmente en países tercermundistas (21).

#### ii. **Carga Viral**

La carga viral es la técnica más específica para detectar el virus, es el mejor indicador pronóstico y de monitorización de tratamiento, pero es costosa y técnicamente compleja (6).

#### iii. **PCR**

Es un método altamente específico y sensible que no se utiliza como método de rutina, permite detectar el RNA viral. Resulta útil en el periodo de ventana, en recién nacidos de madres seropositivas y para confirmar pruebas de WB o ELISA indeterminados (6).

#### **d. Métodos Combinados**

Recientemente se han desarrollado técnicas duales que permiten la detección simultánea de antígeno y de anticuerpos frente al VIH-1, entre estas se encuentra el test Vironostika® HIV Uni-Form II Ag/Ab, que se basa en la detección combinada del antígeno p24 de VIH-1 y las inmunoglobulinas G anti-VIH 1,2 en el suero o plasma humano por técnica ELISA (7, 24,25).

Vironostika® HIV Uni-Form II Ag/Ab:

El test Vironostika® HIV Uni-Form II Ag/Ab, es un ELISA basado en el principio de “sandwich” en un solo paso. Una mezcla de anticuerpos y antígenos VIH marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP) actúa de conjugado, mientras que la tetraetilbencidina (TMB) y el peróxido actúan de sustrato (26-28). Al finalizar la prueba el desarrollo de color sugiere la presencia de anticuerpos o antígenos VIH, mientras que un ligero o ningún desarrollo de color sugiere la ausencia de los mismos (28).

El procedimiento completo para la realización del test se puede observar en el anexo 1.

Los pocillos microelisa de la prueba Vironostika® HIV Uni-Form II Ag/Ab se hallan recubiertos con HIV-1 gp160, péptido HIV-1 ANT70, péptido HIV-2 env (aminoácidos 592-603), para la detección de anticuerpos y anti-HIV 1 p24, para la detección de antígeno (31,32).

### **3. Estrategias en el Diagnóstico Serológico de la Infección por VIH**

En la actualidad, existen diferentes tipos de técnicas de detección de anticuerpos específicos VIH. La selección de la técnica o combinación de técnicas más apropiadas dependerá de: a) objetivo de la prueba; b) sensibilidad y especificidad de las técnicas a utilizar y c) prevalencia de la infección VIH en la población estudiada.

Estrategias en la determinación de anticuerpos:

La O.M.S. recomienda tres estrategias que confieren un máximo de exactitud por un coste mínimo. La estrategia mas apropiada, a cada situación, dependerá del objetivo de la prueba y la prevalencia de la infección VIH en la población.

- Estrategia I: determinación de anticuerpos mediante un único EIA o una técnica rápida/sencilla.
- Estrategia II: todas las muestras reactivas en la primera técnica, son realizadas de nuevo en una segunda técnica de principio o preparación antigénica diferentes. En caso de falta de reactividad del suero en la segunda técnica el resultado se considerará negativo.
- Estrategia III: todas las muestras reactivas en la segunda técnica de la estrategia II, son ensayadas de nuevo con una tercera técnica diferente a las anteriores. En caso de falta de reactividad del suero en la tercera técnica es obligado realizar un Western Blot.

En las Estrategias II y III, la prueba utilizada en primer lugar debe poseer la máxima sensibilidad y la utilizada en segundo lugar debe poseer la máxima especificidad (1,7).

Tabla No. 7  
Estrategias de la determinación de anticuerpos anti-VIH

Objetivo	Prevalencia	Estrategia
A. Seguridad biológica	Cualquier prevalencia	I
B. Diagnóstico		
B.1. CRS/SIDA	Cualquier prevalencia	II
B.2. Asintomático	$\geq 10\%$	II
	$<10\%$	III
C. Serovigilancia	$\geq 10\%$	I
	$<10\%$	II

Se han evaluado test cualitativos como el VIDAS HIV DUO (bioMérieux, Francia), que permite la detección simultánea de antígeno p24 y/o anticuerpos anti VIH-1,2, este es un test de cuarta generación, cuyo principio combina dos reacciones inmuno enzimáticas, con una detección final de fluorescencia. En este estudio se evaluaron sueros de pacientes divididos según su origen (donadores de sangre, muestras de rutina, pacientes seropositivos). Como resultado se obtuvo una especificidad de 99.85% en donadores de sangre, 99.74% en muestras de rutina (8,18,20).

Otros estudios se han realizado en los cuales se compara la especificidad y sensibilidad de dos pruebas automatizadas de cuarta generación para la detección de VIH, (Enzymun-Test HIV Combi y VIDAS HIV DUO) con la sensibilidad y especificidad de la prueba de detección de anticuerpos de tercera generación (HIV-1/HIV-2 3<sup>rd</sup> Generation Plus enzyme immunoassay; Abbott, Delkenheim, Germany) y una prueba de detección de antígeno p24 (HIV-1 Ag monoclonal; Abbott) (29,30). En este estudio se demostró que el uso de pruebas de cuarta generación detectan la infección por VIH en un promedio de 4.8 a 4.4 días antes que las pruebas de tercera generación (9,19,20).

### III. JUSTIFICACION

El diagnóstico de una infección por VIH, en la práctica normal se basa en la detección de anticuerpos séricos anti-VIH por la técnica ELISA por sus siglas en inglés. No obstante existe un período de 3 semanas aproximadamente entre la infección y la aparición de los primeros anticuerpos, este período se conoce como de ventana. Recientes estudios han demostrado que durante este período, el antígeno p24 esta presente en la mayoría de los pacientes infectados por VIH-1.

La detección simultánea del antígeno p24 y de los anticuerpos anti-VIH-1,2 permite reducir el retraso existente entre la infección y el diagnóstico de la misma. Así también permite dar un diagnóstico en niños menores de 18 meses nacidos de madres VIH positivas, dado que estos presentan anticuerpos maternos en sus primeros meses de vida que no son diagnósticos de infección, y en pacientes en estado avanzado de SIDA, que por su inmunocompromiso ya no producen anticuerpos.

La realización de pruebas de confirmación, de los pacientes que resultan seropositivos, por lo general con la prueba de Western Blott que detecta anticuerpos contra proteínas específicas del VIH, se traduce también en un retraso del diagnóstico debido a que por su alto costo y necesidad de personal calificado no se realizan de rutina. La implementación de una prueba que detecte tanto anticuerpos como antígeno p24, como la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, que a su vez se usara como prueba confirmatoria de las pruebas rápidas lograría confirmar con mayor rapidez a las PVVS (personas viviendo con el virus del SIDA) de su condición. Acelerando también el inicio de los tratamientos pertinentes, dando como resultado una mejor expectativa de vida para el paciente.

---

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA AXSYM System HIV 1/2 gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika® Uniform II Ag/Ab

## IV. OBJETIVOS

### General:

- Validar la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, para el diagnóstico de la infección por VIH.

### Específicos:

- Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos negativo y positivo de la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, comparado con la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup>.
- Determinar la concordancia existente entre las pruebas con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup> y la prueba rápida<sup>1</sup>, para el diagnóstico de la infección por VIH.

---

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA AXSYM System HIV ½ gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika® Uniform II Ag/Ab

## **V. HIPÓTESIS**

La concordancia entre la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> y la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup> es mayor del 75 %.

## **VI. MATERIALES Y METODOS**

### **A. Universo de Trabajo**

Se trabajará con 300 muestras de suero de pacientes que acuden a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” a realizarse la prueba para la determinación de la infección por el VIH.

### **B. Muestra**

El suero de 300 pacientes.

### **C. Recursos**

#### **1. Recursos Humanos**

Licda. Blanca Samayoa Herrera, Asesora

Licda. Tamara Velásquez Porta, Co-Asesora

Br. Fabiola Karina Morales C., Tesista

#### **2. Recursos Institucionales**

Laboratorio Clínico A.S.I (Asociación de Salud Integral).

Clínica Familiar “Luis Ángel García” Hospital General San Juan de Dios.

Labtronic

#### **3. Recursos Materiales**

##### **a. Reactivos:**

Reactivos para realización del microelisa Vironostika® HIV Uni-Form II Ag/Ab (proporcionados en el kit).

Agua desmineralizada.

Acido sulfúrico 1N.

##### **b. Equipo y materiales de Laboratorio:**

Tubos vacutainer sin EDTA

Agujas vacutainer

Algodón y alcohol

Gradilla

Pipetas calibradas de 50 ul y 100 ul

Tips

Lector de absorbancia con filtros de 450 y 600 nm (Sigma)

Vórtex

Cloro

Microtubos de centrifuga

Refrigeradora

Marcador indeleble

Cuaderno con espiral para anotar resultados

Guantes desechables

Pizeta plástica

Lentes de bioseguridad

Bata de laboratorio

Computadora con el programa EPI INFO 6.0

## **D. Metodología**

### **1. Fase I : Obtención y proceso de muestras**

- a. Se utilizarán 300 muestras de suero, las cuales serán obtenidas de pacientes que acuden a la Clínica Familiar “Luis Angel García”, así como también, de los paciente internados en el HGSD, a los cuales se les solicita realizar prueba para la determinación de VIH.
- b. A las 300 muestras obtenidas se les realizara la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, las cuales se compararan con el resultado de la prueba rápida<sup>1</sup> y la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup>.

### **2. Fase II: Análisis Estadístico**

- a. Tipo de estudio de las pruebas para el diagnóstico de VIH/SIDA:  
Es un estudio no probabilístico por conveniencia.
- a. La exactitud y consistencia interna de los datos se verificará a través del programa check file del paquete epidemiológico EPI-Info 6.0. Todos los análisis se efectuarán en este mismo programa e incluirán:

- Se determinó la validez con la estimación de la sensibilidad y especificidad relativa.
- Se estimó los valores predictivos negativo y positivo relativos.
- Se determinó la fiabilidad de la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, a través del cálculo del índice *Kappa* entre la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> y la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup>.

Todos los cálculos utilizarán las fórmulas convencionales a un nivel de confianza del 95% y se llevarán a cabo en el paquete epidemiológico Epi-Info 6.0.

---

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA AXSYM System HIV 1/2 gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika<sup>®</sup> Uniform II Ag/Ab

## VII. RESULTADOS

La validación de la prueba ELISA-Ag<sup>3</sup> se realizó utilizando muestras de suero obtenidas de 166 usuarios masculinos (55%) y 136 femeninos (45%). De ellos 127 fueron usuarios ambulatorios (42%) y 175 hospitalizados (58%). Todos los usuarios fueron mayores de edad que se encontraban entre los 18 a los 75 años; que acudieron a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” en el período comprendido del 2 de Septiembre al 16 de Octubre del año 2,002.

A todos los usuarios se les pidió consentimiento por escrito, previo a la toma de muestra para la realización de la prueba de VIH. También como parte del procedimiento de la Clínica Familiar “Luis Ángel García” se proporcionó consejería pre y post prueba de VIH. La Clínica Familiar posee una prevalencia aproximada de casos positivos del 18% anual, lo cual se refleja en la cantidad de pruebas positivas que se obtuvieron durante el presente estudio.

Se obtuvieron un total de 302 muestras de suero a las cuales se les realizó la prueba rápida<sup>1</sup>, la prueba de ELISA-Ac<sup>2</sup>, y la prueba ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, cada una de las pruebas se realizó de forma independiente y sin acceso a los resultados obtenidos para evitar el sesgo en la realización de las mismas. Las muestras fueron procesadas en el período comprendido del 18 de Noviembre al 19 de Diciembre de año 2,002.

De los 302 sueros analizados se obtuvo el 18.21% de muestras positivas (55 muestras), y el 81.79% de muestras negativas (247 muestras), distribuidas como se muestra en la tabla 1.

---

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA AXSYM System HIV ½ gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika® Uniform II Ag/Ab

La primera prueba a la que se sometieron los 302 sueros obtenidos fue la prueba rápida<sup>1</sup>. La sensibilidad y especificidad de esta prueba ya ha sido determinada por Martínez, el cual obtuvo valores de sensibilidad y especificidad de 100.0% (IC<sub>95%</sub>=95.3-100.0) y 99.5% (IC<sub>95%</sub>=98.0-99.99) respectivamente, un valor predictivo positivo relativo del 98.0% (IC<sub>95%</sub>=92.2-99.6) y un valor predictivo negativo relativo de 100.0% (IC<sub>95%</sub>=98.8-100.0) (37).

Tabla 1

**Resultados positivos, negativos e indeterminados obtenidos con las pruebas evaluadas.**

RESULTADO	POSITIVO	NEGATIVO	INDETERMINADO*
Prueba Rápida <sup>1</sup>	55	247	0
ELISA-Ac <sup>2</sup>	55	247	0
ELISA-Ag/Ac <sup>3</sup>	55	247	0

\* Resultados indeterminados solo aplican a la prueba rápida<sup>1</sup>

Estos resultados fueron analizados con el programa estadístico Epi-Info 6.0, con un intervalo de confianza del 95%. Se comparó primero la prueba rápida<sup>1</sup> con la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, se observó una sensibilidad relativa de 98.20% (IC<sub>95%</sub>=89.0-99.9), especificidad relativa de 99.60% (IC<sub>95%</sub>=97.4-100.0), valor predictivo positivo relativo de 98.20% (IC<sub>95%</sub>=89.0-99.9) valor predictivo negativo relativo de 99.60% (IC<sub>95%</sub>=97.4-100.0), eficacia (coeficiente *Kappa*) de 0.97. (Ver tabla 2).

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA AXSYM System HIV 1/2 gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika® Uniform II Ag/Ab

Tabla 2  
**Comparación de la prueba rápida Determine y la prueba ELISA + p24 para detectar anticuerpos contra VIH (N=302)**

Prueba ELISA-Ag/Ac <sup>3</sup>	Prueba rápida <sup>1</sup>		
	Positivo <sub>(n)</sub>	Negativo <sub>(n)</sub>	Total
Positivo	54	1	55
Negativo	1	246	247
Total	55	247	302

	Resultado	Intervalo de Confianza del 95%
Sensibilidad	98.20%	(89.0-99.9)
Especificidad	99.60%	(97.4-100.0)
Valor Predictivo Positivo	98.20%	(89.0-99.9)
Valor Predictivo Negativo	99.60%	(97.4-100.0)
Coeficiente Kappa	0.977770	

Seguidamente se comparó la prueba con fundamento ELISA –Ag/Ac<sup>3</sup> con la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup>, se observó una sensibilidad relativa y especificidad relativa de 98.20% (IC<sub>95%</sub>= 89.0-99.9) y 99.60% (IC<sub>95%</sub> = 97.4-100.0) respectivamente; con un valor predictivo positivo relativo de 98.20% (IC<sub>95%</sub>=89.0-99.9), valor predictivo negativo relativo de 99.60% (IC<sub>95%</sub>=97.4-100.0), eficacia (coeficiente *Kappa*) de 0.97. (Ver Tabla No. 3).

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA AXSYM System HIV ½ gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika® Uniform II Ag/Ab

Tabla 3

**Comparación de las pruebas con fundamento de ELISA para la detección de anticuerpos contra el VIH. (N=302)**

Prueba ELISA-Ac <sup>2</sup>	Prueba ELISA-Ag/Ac <sup>3</sup>		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	54	1	55
Negativo	1	246	247
Total	55	247	302

	Resultado	Intervalo de Confianza del 95%
Sensibilidad	98.20%	(89.0-99.9)
Especificidad	99.60%	(97.4-100.0)
Valor Predictivo Positivo	98.20%	(89.0-99.9)
Valor Predictivo Negativo	99.60%	(97.4-100.0)
Coeficiente Kappa	0.977770	

Las tres diferentes pruebas que se utilizaron en el desarrollo de este estudio dieron un resultado falso positivo (como se puede ver en la Tabla No. 2 y 3), una muestra diferente en cada uno de los casos. En el caso de la prueba rápida<sup>1</sup> se obtuvo una muestra con un resultado positivo débil (muestra número 87), perteneciente a un paciente de género femenino, ambulatorio sin exposición de riesgo para infección por el VIH aparente, la cual presentó un resultado negativo al correr el suero problema con las otras dos pruebas con fundamento ELISA utilizadas.

La muestra de dio resultado positivo con la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup> (muestra 134), perteneciente a un paciente de sexo masculino, ambulatorio, que no se encontraba en ayuno al momento de la toma de la muestra, fue negativa tanto para la prueba rápida<sup>1</sup> como para la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, por lo que fue necesario recurrir a una tercera prueba diagnóstica WB (Western Blot), para confirmar el resultado, el resultado obtenido fue negativo.

La prueba con fundamento ELISA-Ag/Ab<sup>3</sup> dio también un resultado falso positivo (muestra 223), perteneciente a un paciente de género masculino, hospitalizado que presentaba ictericia abundante en el suero, a esta muestra al igual que a la 134 se le realizó una nueva determinación con la prueba de WB para confirmar el resultado. El WB dio un resultado negativo.

---

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA AXSYM System HIV ½ gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika® Uniform II Ag/Ab

## VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

Los 302 usuarios que se incluyeron en el estudio se distribuyeron en un 55% de usuarios de género masculino y un 45% de género femenino, de los cuales resultaron 55 usuarios positivos para la determinación de la infección por VIH un 54.4% (30 casos) en hombres y el 45.6% (25 casos) restante en mujeres. Estos datos dan un valor de prevalencia de la infección por VIH del 18.21%.

Uno de los objetivos de este estudio era determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos negativo y positivo de la prueba ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, comparado con la prueba ELISA-Ac<sup>2</sup>, así como la concordancia de la misma con la prueba rápida<sup>1</sup>. La sensibilidad se define como la capacidad de la prueba para los individuos verdaderamente positivos, es decir, de diagnosticar correctamente los enfermos. Los valores predictivos positivo y negativo, se refieren a la frecuencia de individuos infectados entre las personas con resultados positivos o la frecuencia de individuos no infectados entre la personas con resultado negativo respectivamente (38). El coeficiente o índice *kappa*, es un indicador de concordancia casual, es decir expresa la fiabilidad o buena repetibilidad de una prueba (18).

Al comparar la prueba rápida<sup>1</sup> con la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup>, se observó una sensibilidad relativa de 98.20% (IC<sub>95%</sub>=89.0-99.9), especificidad relativa de 99.60% (IC<sub>95%</sub>=97.4-100.0), valor predictivo positivo relativo de 98.20% (IC<sub>95%</sub>=89.0-99.9) valor predictivo negativo relativo de 99.60% (IC<sub>95%</sub>=97.4-100.0), eficacia (coeficiente *Kappa*) de 0.97.

Al comparar la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> con la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup> se obtuvieron los datos de sensibilidad de un 98.20% (IC<sub>95%</sub>=89.0-99.9) y especificidad de un 99.60% (IC<sub>95%</sub>=97.4-100.0) respectivamente. Estos datos son similares a los obtenidos en un estudio realizado en Buenos Aires, Argentina en el cual se comparó la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>3</sup> con otra prueba

---

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA Axsym System HIV 1/2 gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika® Uniform II Ag/Ab

de diagnóstico de cuarta generación, esta investigación dió como resultado una especificidad del 99.4% y una sensibilidad del 95.65% para dicha prueba, esta investigación también se realizó en una población con una alta prevalencia de casos positivos para la infección por el VIH (19% de prevalencia) (34). Esto muestra que los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba con fundamento ELISA-Ag<sup>3</sup> se mantienen constante en poblaciones con un índice de prevalencia de infección por el VIH similares.

Los resultados de las pruebas tanto prueba rápida<sup>1</sup>, prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup> y prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> que dieron resultados discordantes entre sí fueron realizados por duplicado, para eliminar el error humano que se pudiese haber cometido en la primera corrida de las muestras, este dato se tomó como dato real en la realización de los cálculos estadísticos que se llevaron a cabo, (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, y valor predictivo negativo relativos).

Para la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup> las muestras que durante la primera corrida dieron resultado en zona gris (entre 0.5 y 1.0 del valor de absorvancia) se repitieron, y si el valor persistía en zona gris se tomaron como resultados negativos. Lo mismo se realizó para la prueba con fundamento ELISA-Ag<sup>3</sup> en la cual los resultados muy cercanos al punto de corte (cut off) se repitieron, para evitar resultados falsos positivos.

Para la prueba rápida<sup>1</sup>, no se obtuvieron pruebas indeterminadas, entendiéndose como prueba indeterminada o no específica una prueba rápida que presenta una ligera o muy discreta banda en la casilla de muestra y una banda control evidente, por lo cual no se puede decir con certeza que esta se encuentra positiva pero no se le puede dar como negativa tampoco (35).

El resultado falso positivo que se obtuvo con la prueba a validar pudo tener su origen en la ictericia que se presentó en la muestra problema, debido a que la lectura de la prueba se realiza por medio de la medición del cambio de absorbancia de las muestras provocado por el cambio de intensidad en el color en los casos positivos. En este caso se observó la importancia de contar con controles positivos y negativos en cada corrida de muestras, ya que el valor de cut-off o punto de corte (valor arriba del cual una prueba es considerada positiva) puede variar de corrida en corrida.

En la muestra con resultado falso positivo para la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup>, dicho resultado pudo tener su origen en el error humano, contaminación de la muestra con alguna positiva o algún tipo de interferencia presente en la muestra. Lo mismo se aplica con la muestra falsa positiva para la prueba rápida<sup>1</sup>. Además hay que tomar en cuenta que tanto la prueba rápida<sup>1</sup> como ambas pruebas con fundamento ELISA que se utilizaron en este estudio son pruebas de tamizaje, por lo que poseen una alta sensibilidad y es más factible que aparezcan resultados falsos positivos ya que no tienen la misma especificidad que las pruebas confirmatorias.

Debido a que en el momento de realizar los cálculos estadísticos no se tomó en cuenta la confirmación realizada de las muestras discordantes se tiene que la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup> y ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> dieron un 0.33% de pruebas falsas positivas. Lo cual es consistente para la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> con otro estudio realizado en Lyon, Francia, en el cual se compararon dos pruebas con fundamento ELISA que detectaban tanto antígeno p24 como anticuerpos contra el VIH, dando un 0.23% de resultados falsos positivos en un lote de 5,141 muestras y 0.18% en un lote de 3,907 muestras (36).

Debido a los resultados falsos positivos que se obtuvieron en las determinaciones y el hecho que fueran tres muestras diferentes las que dieron datos discordantes, el valor predictivo positivo relativo fue de 98.20% y el valor predictivo negativo relativo de 99.60% para cada prueba respectivamente.

Lamentablemente no se obtuvo evidencia de algún caso que se encontrara en período de ventana entre los 302 sueros examinados, esto hubiera sido evidente al tener una muestra que diera un claro resultado positivo con la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> y resultados negativos tanto con la prueba rápida<sup>1</sup> como con la prueba con fundamento ELISA-Ac<sup>2</sup> en un paciente con conducta de riesgo y un seguimiento para comprobar el desarrollo de anticuerpos contra el VIH y posteriormente dar las pruebas anteriores positivas (28).

Esta situación hubiera proporcionado una idea más veraz de la utilidad de la presencia del antígeno p24 en las pruebas de detección de la infección por VIH para la reducción del tiempo de diagnóstico en comparación con las pruebas que determinan únicamente la presencia de anticuerpos anti VIH en las muestras. Esta misma situación se observó en un estudio realizado en Buenos Aires, Argentina, en el cual se contó con 2 sueros en etapa de conversión y la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> dio un resultado positivo para una muestra únicamente, pero este resultado no fue suficiente para calcular su sensibilidad (34).

Al examinar los resultados estadísticos de la comparación entre la prueba a validar y la prueba que se utilizó como estándar de oro la concordancia entre las mismas fue óptima (coeficiente *Kappa* de 0.977), lo que nos indica que ambas tienen una buena correlación, por lo cual se puede utilizar la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> como un similar del la prueba utilizada como estándar de oro (ELISA-Ac<sup>2</sup>).

En los 302 usuarios que se incluyeron en el estudio realizado se contó con la colaboración de un 55% de hombres y un 45% de mujeres, los casos positivos distribuidos en un 54.4% y un 45.6% respectivamente, lo que no se considera un diferencia significativa en prevalencia según el sexo del paciente.

La prevalencia de casos positivos del 18.21%, lo cual concuerda con los datos estadísticos que se presentan anualmente en la Clínica Familiar “Luis Ángel García”, que es del 18.00% anual.

Este dato de prevalencia no es representativo en toda la población del país debido a que el enfoque de servicio de la Clínica Familiar esta dirigido principalmente a el sector que mantiene más alto nivel de riesgo de exposición con el virus, como lo son familias numerosas de escasos recursos, que no tienen el acceso a la información de prevención de la enfermedad, trabajadoras del sexo, personas con preferencias homosexuales, también personas que utilizan drogas, y el personal médico y paramédico que trabaja en el Hospital General San Juan de Dios por estar en contacto con los anteriores.

## IX. CONCLUSIONES

1. La sensibilidad de la prueba con fundamento de ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> para la detección de anticuerpos y/o antígeno p24 contra el VIH fue de 98.2% en la población muestreada.
2. La especificidad de la prueba ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> fue de 99.60% (IC<sub>95%</sub>=97.4-100.0).
3. El valor predictivo positivo para la prueba ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> fue de 98.2% (IC<sub>95%</sub>=89.0-99.9).
4. El valor predictivo negativo para la prueba fue 99.60% (IC<sub>95%</sub>=97.4-100.0).
5. El grado de concordancia (coeficiente *Kappa*) entre ambas pruebas con fundamento de ELISA para la detección de anticuerpos contra el VIH fue óptima (0.977), lo cual válida la funcionalidad de la prueba estudiada.
6. La prevalencia de VIH en la población estudiada fue de 18.21%.
7. La prueba ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> es una prueba sencilla de fácil realización, sensible y específica.

---

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA AXSYM System HIV ½ gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika<sup>®</sup> Uniform II Ag/Ab

## X. RECOMENDACIONES

1. Utilizar la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> como complemento de alguna otra prueba de tamizaje como la prueba rápida<sup>1</sup>, para la confirmación del diagnóstico de la infección por el VIH, principalmente en lugares donde se procesan grandes cantidades de muestras y no se cuenta con acceso a equipo automatizado.
2. Asegurar la realización de controles de calidad (control negativo y positivo), por lo menos cada x número de muestras analizadas o en cada corrida, para descartar resultados falsos positivo o negativo.
3. En la utilización de la prueba con fundamento ELISA-Ag/Ac<sup>3</sup> es muy importante el proceso de lavado de las muestras por lo cual se recomienda la utilización si fuera posible de un lavador automático, y de esta forma disminuir el error humano en la corrida y mantener un valor de cutt off constante.

---

<sup>1</sup> Prueba Rápida Determine HIV 1,2 de Abbott

<sup>2</sup> ELISA AXSYM System HIV ½ gO, Abbott

<sup>3</sup> ELISA Vironostika® Uniform II Ag/Ab

## XI. REFERENCIAS

1. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus. *Microbiol. Rev* 1993.
2. Strine G. Acquired immune deficiency syndrome. Prentice Hall. Inc; Englewood Cliff, New Jersey. 2d. Edic. 1996. Pag. 40.
3. Letvin N. Animal models of AIDS. *Inmol Today* 1990. 11(9): 322-326.
4. Gatell JM *et al*, Guía Práctica del SIDA, 6ta ed. Masson S.A. Barcelona 2,000.
5. Horburg CR Jr, Ou CY, Jason J, *et al*. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* 1989; 2:637-340
6. Cohen P, Sande M, Volverding P (eds). The AIDS knowledge base. 2nd de. USA. Brown and Company, 1994
7. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, *et al* (eds). AIDS: etiology, diagnosis, treatment, and prevention. 3<sup>rd</sup> de. Philadelphia, JB Lippincott, 1992.
8. Benitez L. Las Formas Preclínicas del SIDA. México. *Rev. Med. IMSS*. 1988. Julio 26(4) 157-187
9. Berkow R. El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica. 9<sup>a</sup>. Edic. Mosby/Doyma. Madrid, España 1994. 3122p. (p 32-92)
10. Pair JP, Chadwick MD. The biologic and clinical basis of infectious diseases, eds Shulman ST, Phair JP, Sommers HM. Philadelphia: WB Saunders, 1992: 383.
11. Kalyanaraman VS *et al*. AIDS reserch and human retroviruses. 1988;4:319-329.
12. Estrada R. Clasificación Revisada para infección por VIH y Definición de casos para SIDA entre Adolescentes y Adultos. *Rev Med No.2, Vol. 3, 1993 p.35-42*
13. White D, Gold J. Medical Managment of AIDS Patients. *Med Clin of North Am*. 1992. 76(1):1-287
14. Davey RJ Jr, Lane HC, Laboratory methods in the diagnosis and prognostic staging of infection with human immunodeficiency virus type 1. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 912-93.
15. Campos JM. Laboratory methods for early detection of human immunodeficiency virus type 1 in newborns and infants. *Cli. Microbiol. Rev*. 1992; 5:238-247.
16. Hammer S, Crumpacker C, D'Aquila R, Jackson B, Lathey J, Livnat D, Reichelderfer P. Use of virological assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: recommendations of AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *J Clin Microb* 1993; 31:2557-2564.

17. Jackson JB, Balfour HH. Practical diagnostic testing for human immunodeficiency virus. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1:124-138.
18. Kenny DF, Garsia RJ, Gatenby PA, Basten A. Identification of biological false positives in anti-HIV antibody tests [Letter]. *AIDS* 1987; 1:63-64.
19. Ortiz de Lejarazu R, Cisterna R, Eiros JM, González A, Maroto MC, Pumarola T, Romero J. Diagnóstico Microbiológico de la infección por VIH. En: Picazo JJ (ed). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid, 1998, número 6B.
20. Farnham P, *et al.* Counseling and Testing for HIV Prevention: Cost, Effects, and Effectiveness of more rapid Screening Test. *Public Health Rep.* 1996. 11:44-53
21. Anónimo. Centers for Disease Control. Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1989; 38:1-7.
22. Anónimo. World Health Organisation. AIDS. Proposed WHO criteria for interpreting results from western blot assays for HIV-1, HIV-2 and HTLV-I/HTLV-II. *Weekly Epidemiol Record* 1990; 65:281-283.
23. Van Binsbergen J, Keur W, van der Graaf M, Siebelink A, Jacobs A, de Rijk D, Toonen J, Zekeng L, Afane-Ze E, Gurtler LG. Strongly enhanced sensitivity of a direct anti-HIV-1/2 assay in seroconversion by incorporation of HIV p24 Ag detection: a new generation Vironostika HIV Uni-Form II. *J Virol Methods* 1998; 76:59-71.
24. Weber B, Fall EH, Berger A, Doer HW. Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2235-2239.
25. Zaaijer HL, van Rixel GA, Kromosoeto JN, Balgobind-Ramdas DR, Cuypers HT, Lelie PN. Validation of a new immunoblot assay (LiaTek HIV III) for confirmation of human immunodeficiency virus infection. *Transfusion* 1998; 38:776-781.
26. *Journal of Infectious Diseases*. Use of four different HIV antibody test 2002;186:1181-1185.
27. De Leys RJ, Vanderborght M, Vanden Haesevelde M *et al.* Isolation and partial characterisation of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of West-Central African origin. *J. Virol* 1990;64:1207-1216
28. Hashida S *et al.* Earlier diagnosis of HIV-1 infection by simultaneous detection of p24 antigen and antibody IgGs to p17 and reverse transcriptase in serum with enzyme immunoassay. *L Clin Lab Anal* 1996;10:213-219
29. Gómez B. Infección por VIH. FEPAFEM. Bogotá, Colombia. 2000; 1-7 p.

30. T.D. LY, M. Lapeyre and E. Brignoli. Evaluation of VIDAS HIV DUO for the simultaneous detection of p24 Ag HIV-1 and HIV-2 antibodies. 12<sup>th</sup> World AIDS Conference Geneva Switzerland June 28 - July 3; p 115-119. 1,998.
31. Weber B. *et al.* Reduction of Diagnostic Window by New Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assays. *J. Cli. Microbiol.* Aug. 1,998 p 2235-2239.
32. Nadal D. *et al.* Prospective Evaluation of Amplification -Boosted ELISA for Heat Denatured p24 Antigen for Diagnosis and Monitoring of Pediatric Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Infec. Dis.* 1,999; 180:1089-95
33. World Health Organisation. Global Programme on AIDS. Recommendations for the selection and use of HIV antibody test. *Weekly Epidemiol Record* 1992; 67:145-152.
34. Zapiola I. *et al.* Evaluation of two HIV Fourth Generation Assays in a high HIV prevalence population from Buenos Aires, Argentina. *Int Conf AIDS.* 2002 Jul 7-12; 14: abstract no. C11055.
35. Manual de Procedimientos Laboratorio Clínico ASI
36. P. Moncharmont, *et al.* Essai de Deux Reactifs Combines de Depistage des Anticorps Diriges Contre les Virus de L'immunodeficiency Humaine Types I et 2. E.T.S. of Lyon 1-3, street of Vercors - 69364 Lyon Cedex 07. France.
37. Martínez, M. Optimización del retorno del usuarios que reciben orientación en el diagnóstico de VIH a través del uso de la prueba rápida. (Tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia ) 2000. (p. 4-10)
38. Constantine, N. *et al.* Pruebas para l detección del VIH y control de calidad. Guía para personal de laboratorio. AIDSTECH. USA. 1991. (p.33-34, 82-83).

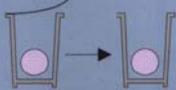
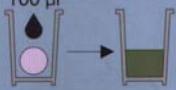
# XI. ANEXOS

## Anexo No. 1

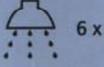
Procedimiento para la realización del test Vironostika® HIV Uni-Form II Ag/Ab.

*Worksheet\** **organon**teknika

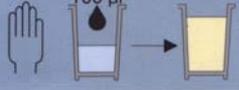
**Vironostika® HIV Uni-Form II Ag/Ab**

- 1** Remove strip sealers  

- 2** Pipet 100 µl specimen diluent into all wells, including control wells  

- 3** Pipet 50 µl sample or control into the assigned wells  

- 4** Agitate  
Incubate at 37 ± 2°C for 60 ± 5 minutes  

- 5** Wash six times with phosphate buffer  

- 6** Pipet 100 µl TMB substrate into each well  
Do not mix or agitate  

- 7** Incubate at 15-30°C for 30 ± 2 minutes  

- 8** Pipet 100 µl 1 mol/l sulfuric acid into each well  

- 9** Read at 450 nm ± 5 nm or 450 nm ± 5 nm and 620-700 nm  


Anexo No. 2

**ANALISIS DE RESULTADOS**

Test de referencia (Abbott)

		+	-
Vironostika	+	<b>a</b>	<b>b</b>
	-	<b>c</b>	<b>d</b>

Anexo No. 3

**ESCALA DE CONCORDANCIA KAPPA**

<i>Kappa</i>	<b>Concordancia</b>
< 0.00	Malo
0.00-0.20	Pobre
0.21-0.40	Sufrible
0.41-0.60	Regular
0.61-0.80	Buena
0.81-0.99	Optima
1.00	Perfecta

**Tomado de:** Maclure M., *et al.* Misinterpretation and misuse of the *Kappa* statistic. American Journal of Epidemiology, 1987;126:161-169.