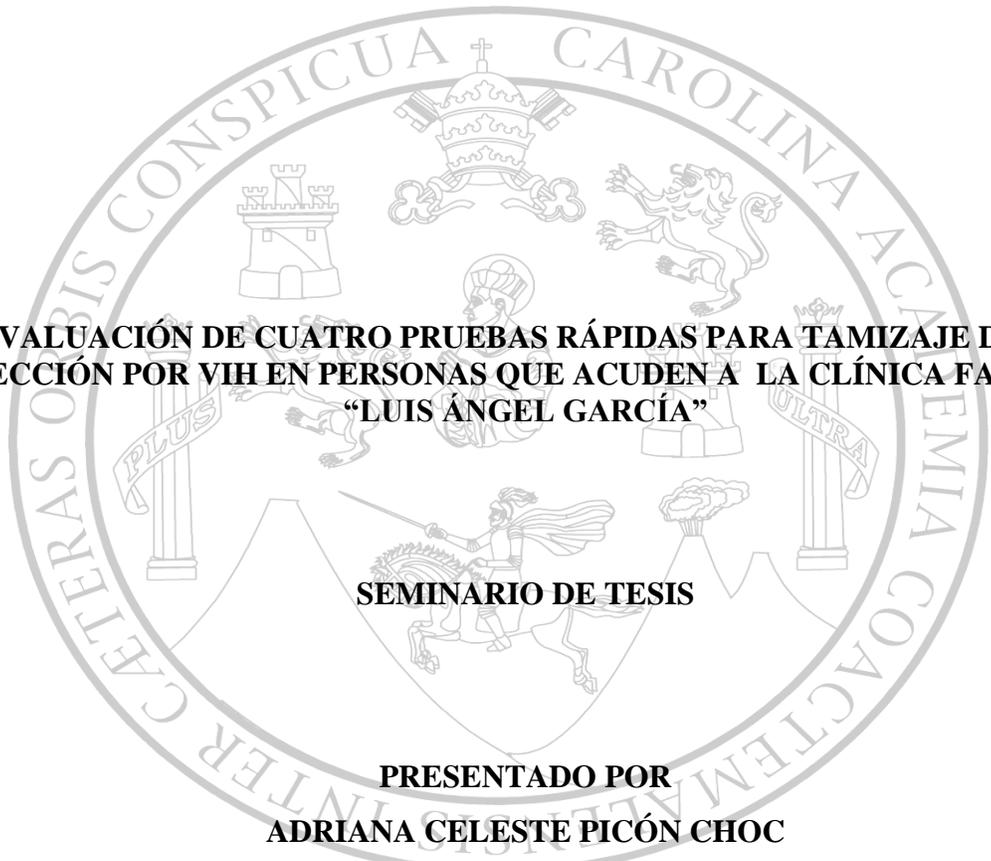


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central shield with a figure on horseback, a crown above, and various symbols including a castle, a lion, and a cross. The shield is flanked by two columns with banners that read 'PLUS' and 'ULTRA'. The outer ring of the seal contains the Latin motto 'CETERAS OBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEM' and 'INTER'.

**EVALUACIÓN DE CUATRO PRUEBAS RÁPIDAS PARA TAMIZAJE DE LA
INFECCIÓN POR VIH EN PERSONAS QUE ACUDEN A LA CLÍNICA FAMILIAR
“LUIS ÁNGEL GARCÍA”**

SEMINARIO DE TESIS

**PRESENTADO POR
ADRIANA CELESTE PICÓN CHOC
MARÍA MERCEDES MAZARIEGOS MALDONADO**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICAS BIÓLOGAS**

GUATEMALA, JUNIO DE 2012

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

ÍNDICE

I.	Ámbito de la investigación	1
II.	Resumen	3
III.	Antecedentes	4
	A. Aspectos generales de la epidemia de VIH/sida	4
	1. Características generales del VIH	4
	2. Epidemiología	4
	3. Epidemiología en Guatemala	5
	B. Mecanismos de transmisión del VIH	6
	1. Fundamentos biológicos de la transmisión	6
	2. Formas de transmisión	7
	C. Evolución de la enfermedad	8
	1. Fase precoz, aguda o primoinfección	8
	2. Fase intermedia o crónica	9
	3. Fase final o de crisis	9
	D. Cinética de la respuesta inmune	9
	1. Individuos infectados	9
	2. Pacientes progresores lentos	10
	E. Diagnóstico de la infección por el VIH	10
	1. Métodos directos	11
	2. Métodos indirectos	11
	F. Importancia de las pruebas rápidas	13
	1. Determinación de la exactitud y confiabilidad de las pruebas rápidas	14
	2. Prueba rápida DoubleCheckGold™ HIV 1 & 2 (Orgenics)	14
	3. Prueba rápida HIV1/2 STAT-PAK™ DIPSTICK(Chembio)	15
	4. Prueba rápida RETROCHECK-HIV (Qualpro Diagnostics)	17
	5. Prueba rápida Colloidal gold (Kehua Bioengineering)	18
IV.	Justificación	20
V.	Objetivos	21
VI.	Hipótesis	22
VII.	Materiales y métodos	23

A. Universo de trabajo	23
B. Muestra	23
C. Recursos	23
1. Recursos humanos	23
2. Recursos institucionales	23
3. Recursos económicos	24
4. Recursos materiales	24
D. Metodología	25
VIII. Aval de la instancia oferente	27
IX. Resultados	28
X. Discusión de resultados	32
XI. Conclusiones	37
XII. Recomendaciones	38
XIII. Referencias	39
XIV. Anexos	44

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas basadas en reportes de los Estados Miembros, a finales de 2007 había 33,2 millones de infectados por el VIH. Ese mismo año se infectaron 2,5 millones de personas y 2,1 millones murieron de sida¹, entre ellos 330,000 niños. Se sabe que existe subreporte de casos debido a múltiples razones, entre ellas, la dificultad del diagnóstico (1).

El diagnóstico de la infección por VIH normalmente se hace de manera indirecta, mediante la demostración de anticuerpos específicos contra el virus (2). Estos anticuerpos se encuentran prácticamente en el 100% de los sujetos infectados por VIH y constituyen un marcador de la respuesta inmune humoral contra el virus (3). Las pruebas de anticuerpos contra VIH invariablemente requieren que se disponga de al menos dos ensayos de diferente principio inmunológico: una prueba de tamizaje y una prueba de confirmación o dos pruebas de tamizaje de diferente principio inmunológico (4). La mayoría de las pruebas de tamizaje se basan en el principio del inmunoensayo, deben ser extremadamente sensibles para minimizar la posibilidad de obtener un resultado falso negativo, también deben tener la capacidad de detectar los anticuerpos de baja afinidad que se encuentran al inicio de la infección primaria y los anticuerpos dirigidos contra todos los subtipos diferentes de VIH (5). Si el resultado de esta prueba de tamizaje es positivo, esto debe confirmarse mediante al menos un ensayo confirmativo (6).

Actualmente se dispone de varias pruebas rápidas de VIH, se basan en uno de cuatro principios inmunodiagnósticos, entre ellos la inmunocromatografía. En la mayoría de los casos los resultados están disponibles en 15 a 30 minutos; con frecuencia usan sangre total o de vasos capilares según los recursos, las gotas de sangre deshidratadas pueden representar una herramienta útil y no costosa para el almacenamiento y el transporte de las muestras, de manera alternativa puede utilizarse otros fluidos, muchas contienen un control interno inherente (4,5). Estas pruebas pueden resultar útiles si el resultado se necesita pronto: en salas de urgencias, especialmente quirúrgicas y de labor y partos, después de accidentes de punción con agujas, y para aumentar el índice de retorno, son de gran utilidad para los países en vías de desarrollo en los que las instalaciones no son suficientes para el almacenamiento y el transporte de muestras a temperaturas bajas, no se dispone de pruebas de costo elevado para tamizaje o éstas se utilizan únicamente para confirmación, su uso es distinto según la población a la que se aplique (4,7).

¹ Según el diccionario de la Real Academia de la Lengua 22Ed. 1991 en donde se considera al sida una enfermedad y una palabra de la lengua vernácula por lo que no se escribe en siglas o con mayúsculas

En Guatemala se ha realizado vigilancia de la epidemia de VIH desde la década de los 80, a partir de 2003 ésta incluye además la vigilancia en mujeres trabajadoras del sexo y la vigilancia centinela de mujeres embarazadas en Áreas de Salud prioritarias del país utilizando métodos de tamizaje (8). Una evaluación de campo realizada con pruebas rápidas para VIH, permitió proponer un algoritmo tanto de diagnóstico como de vigilancia que a partir de 2003 puede ser usado en laboratorios sin infraestructuras especializadas o por personal primario (técnicos). Éste algoritmo está basado en pruebas rápidas de bajo costo como herramientas de tamizaje, y pruebas ELISA para confirmación de casos, dejando de lado la utilización de Western Blot como estándar de oro para diagnóstico de la infección por VIH (9).

Los esfuerzos por mejorar el diagnóstico de VIH continúan, como parte de ello se han evaluado herramientas diagnósticas como pruebas rápidas, que ofrecen ventajas técnicas y económicas, buscando que sean fiables y que cumplan con alta sensibilidad.

Este estudio tuvo como objetivo validar las pruebas rápidas Dipstick HIV1/2 STAT-PAK™ (Chembio), Doublecheck™ HIV 1&2 (Orgenics), Retrocheck-HIV™ (Qualpro Diagnostics), y Colloidal Gold™ (Kehua Bioengineering), determinando su exactitud a través de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo y fiabilidad a través de la concordancia por índice *Kappa* para el tamizaje de infección por VIH con respecto al estándar de oro relativo, la prueba rápida Determine HIV1/2™ (Inverness) para el tamizaje de infección por VIH en la población guatemalteca.

II. RESUMEN

El diagnóstico de la infección por VIH usualmente se hace de manera indirecta mediante la demostración de anticuerpos específicos contra el virus. Actualmente se dispone de varias pruebas rápidas de VIH basadas en el principio de inmunocromatografía, entre ellas, Dipstick HIV 1/2 STAT-PAK™ (Chembio), Doublecheck™ HIV 1&2 (Orgenics), Retrocheck-HIV™ (Qualpro Diagnostics), y Colloidal Gold™ (Kehua Bioengineering), pruebas que se evaluaron en la presente investigación para tamizaje de VIH en pacientes de la Clínica Familiar “Luis Ángel García” (CFLAG) comparándolas con un estándar de oro relativo, la prueba rápida Determine™ HIV 1/2 (Inverness). Se evaluó exactitud a partir de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN), y fiabilidad, a través de la concordancia con la estimación del índice Kappa para tamizaje de la infección por VIH.

Se utilizaron 2,504 muestras de suero separadas en dos grupos: 1) baja prevalencia (0.3%) y 2) alta prevalencia (10.0%). Las pruebas con resultados indeterminados fueron descartadas para el análisis. Se realizaron 9,732 pruebas rápidas entre ambas poblaciones. La exactitud estimada en la población con baja prevalencia fue mayor de 99% en todos los parámetros para las pruebas Dipstick, Doublecheck y Colloidal Gold demostrando que estas pruebas pueden utilizarse en dicha población, a diferencia del test Retrocheck, en el que se observó 0.51% de falsos positivos, 0.08% de falsos negativos, sensibilidad 75% y especificidad 33% demostrando que esta prueba no es apta para su uso en este tipo de población. Todos los intervalos de confianza en los parámetros de sensibilidad y VPP en la población con baja prevalencia fueron amplios determinando que en esta población se deben evaluar pruebas con mayor cantidad de muestras. En la población con alta prevalencia de VIH la exactitud estimada en todas las pruebas rápidas estuvo sobre 97.4% con intervalos de confianza estrechos para todas las pruebas rápidas evaluadas demostrando que pueden usarse en dicha población. La fiabilidad para todas las pruebas evaluadas fue mayor a 0.99 que se califica como excelente para estos tipos de población y permitió inferir que el uso de las pruebas es fiable en las poblaciones estudiadas.

La estimación de la exactitud y fiabilidad de las pruebas permitió establecer la confiabilidad de las pruebas Dipstick HIV1/2 STAT-PAK™, Doublecheck™ HIV 1&2, y Colloidal Gold™, para su uso en el tamizaje de la infección por VIH en las poblaciones estudiadas y rechazar el uso de la prueba rápida Retrocheck HIV™ en la población con baja prevalencia de VIH.

III. ANTECEDENTES

A. ASPECTOS GENERALES DE LA EPIDEMIA DE VIH/sida.

1. Características generales del VIH y sida¹

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia de los retrovirus, subfamilia lentivirus (10).

El sida es la expresión patológica última de la infección por el VIH, se caracteriza por una inmunodepresión progresiva que sin acciones terapéuticas y preventivas puede llegar a ser fatal, que conduce al desarrollo de infecciones oportunistas, neoplasias secundarias y manifestaciones neurológicas (11).

Hasta la fecha se han descubierto dos tipos de virus: VIH-1 y VIH-2, este último, se encuentra sobre todo en algunos países africanos y parece estar más relacionado con los virus de la inmunodeficiencia simiana, además parece ser miembro de una familia diferente de lentivirus (12,13).

2. Epidemiología

Desde los inicios de la epidemia de VIH/sida en 1980, los especialistas comenzaron a proponer diferentes teorías del surgimiento del VIH. La teoría más aceptada sobre el origen del VIH es que este virus existía ya desde la década del 50, y que se diseminó fácilmente por el mundo (14). Esto coincidió con la liberación sexual de los años sesenta y la facilidad de comunicaciones en el mundo (15).

Datos obtenidos del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre VIH/sida (ONUSIDA) indican que a finales del año 2007 el número de personas viviendo con VIH se estimó en 33 millones de personas, ello indica que la epidemia no ha sido controlada. Más del 90% de las personas infectadas por el VIH viven en países en vías de desarrollo, en los que aparece el mayor porcentaje de defunciones (1).

Los datos parecen indicar que el patrón de la epidemia cambia, pues las mujeres presentan una equiparación con los hombres, ya que constituyen más del 40% de los adultos infectados, siendo antes los hombres el doble que las mujeres, las tendencias no muestran ningún indicio de que esta tendencia de igualdad se invierta (1,15).

El período de incubación es muy largo, comienza desde que el individuo se infecta hasta que aparecen los primeros síntomas de inmunodeficiencia, con una variación de 3 a 10 años, la cual parece asociarse con las condiciones de vida, ya que el periodo suele ser más corto en los países en desarrollo. Los periodos de mayor transmisibilidad del VIH/sida corresponden con los de mayor viremia, es decir, al inicio de la infección y en la fase más avanzada del sida (1).

A medida que se ha dispuesto de los métodos apropiados de diagnóstico de la infección, se ha recurrido a otras estrategias para aproximarse a la magnitud y las tendencias de la epidemia, como los estudios de seroprevalencia en "poblaciones centinelas", los estudios de incidencia en cohortes seleccionados de pacientes con riesgo de infección y los modelos matemáticos de predicción (1).

En los próximos 20 años se estima que, de seguir las tendencias actuales, otros 68 millones de personas podrían morir prematuramente como consecuencia del VIH/sida, la mayoría en el África subsahariana (1).

A diferencia de otras enfermedades relacionadas con la pobreza, el VIH afecta fundamentalmente a personas jóvenes sexualmente activas, que se encuentran en las edades más productivas de sus vidas. Se estima que la epidemia ha causado más de 14 millones de huérfanos, y que en algunos de los países más afectados de África la esperanza de vida al nacer retrocederá más de 15 años a causa de la misma. A finales de 2007, menos del 4% de los infectados de los países de baja y mediana renta recibían tratamiento antirretroviral, y menos del 10% de las personas tenían acceso a cuidados paliativos o tratamiento de las infecciones oportunistas (1).

3. Epidemiología en Guatemala

En 1984 se reportó el primer caso de VIH Guatemala, a partir de julio del 2003 se inició la notificación obligatoria de casos de VIH/sida por medio del Programa Nacional de ITS/VIH/sida (PNS) y de acuerdo al decreto ley 27-2000, como resultado de limitaciones en el sistema de notificación, se estimó que la cantidad de casos era mayor que la contabilizada (9). A pesar de ello, las cifras existentes permitieron realizar análisis cuantitativos y cualitativos de la situación. Hasta el 2001 en Guatemala se reportaron 16,895 casos de sida (proporción de casos sida notificados 168.35 por 100,000 habitantes), el 68.9% de los casos de sida se reportó en los 6 años anteriores a 2003 (8).

La vía de transmisión más frecuente fue la sexual (94.3%), la segunda causa de infección por VIH, por medio de la transmisión madre-hijo (5%) (9).

Las cifras provenientes de reportes de casos que indican que la vía de transmisión más importante en Guatemala ha sido sexual, muestran que por un lado el componente de la transmisión heterosexual ha ido en aumento, pero que el grupo de Hombres que tienen Sexo con otros Hombres (HSH) sigue siendo vulnerable y que su papel como grupo de conexión en la diseminación del VIH se considera como factor importante (16).

Desde la detección del primer caso de sida, en 1984 hasta noviembre 2009, se reportan 20,484 casos de SIDA y VIH, 63% de los cuales son hombres, en su mayoría de 20 a 39 años de edad. La transmisión sexual representa el 94% de los casos y la materno-infantil el 5% (17).

La epidemia de sida en Guatemala es concentrada, tanto geográfica como poblacionalmente. Al 2009, el 78% de los casos reportados corresponde a 7 de los 22 departamentos del país. La prevalencia en población general es de de 0.8% (17).

En cambio, en las poblaciones más vulnerables abordadas por el proyecto del Fondo Mundial, se registraron las siguientes prevalencias entre 2006 y 2008 (17): Mujeres embarazadas de 0.53% a 0.32%; HSH de 10.54% a 7.55%, trabajadoras sexuales de 2.89% a 1.73%, privados de libertad de 1.3 a 1.44, jóvenes en riesgo social de 5.21% en 2007 a 6.98% en 2008, pacientes con TB se ha encontrado de 22.91% a 31.72% de co-infección.

B. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DEL VIH

1. Fundamentos biológicos de la transmisión

El VIH puede atravesar la barrera mucosa intacta por diversos mecanismos potenciales, como infección directa de las células epiteliales o de las células de Langerhans intraepiteliales, por transcitosis o por transmigración de células infectadas; el paso directo a través de abrasiones o ulceraciones facilita mucho la infección. Es posible que las primeras células infectadas sean los linfocitos y que luego las células dendríticas sean las encargadas de diseminar la infección hasta los ganglios linfáticos en unas horas (18,19).

El VIH, en los pacientes no tratados, se puede encontrar de forma permanente en la sangre, en los líquidos biológicos más relacionados o contaminados con el compartimento plasmático, y en las secreciones genitales. La piel es una buena barrera frente al VIH (20).

2. Formas de transmisión

i. Transmisión sexual

La transmisión heterosexual tiene una enorme eficiencia, es mayor de hombre a mujer con riesgo entre 1 y 8 veces superior por mayor volumen y concentración de virus en el semen que en el fluido cérvico-vaginal y mayor tiempo de exposición en el caso de la mujer (21,22).

El contacto oral-genital, el contacto genital con mucosa, el contacto de sangre o líquido menstrual y la exposición a lesiones de herpes genital pueden facilitar la transmisión en mujeres que tienen sexo con mujeres (15,23). La transmisión homosexual entre varones es mayor, debido a las características de su conducta sexual por mayor número de parejas, prácticas con mayor potencial de lesionar mucosas (15).

La transmisión está ampliamente condicionada por múltiples factores como infectividad del portador, conducta sexual, susceptibilidad del huésped, factores del propio virus y profilaxis post-exposición (24,25).

ii. Transmisión parenteral

Diversos mecanismos están implicados en la transmisión del VIH por esta vía.

ii.i Uso de drogas por vía parenteral

La infección se da de manera directa compartiendo las jeringuillas de inyección. La eficiencia de la transmisión es mayor que la de las relaciones sexuales. La intensidad de la drogadicción, del intercambio de jeringuillas usadas y del número de compañeros con el que se comparten, es un factor de riesgo para la transmisión (26).

ii.ii Transfusiones de sangre y derivados

Las transfusiones de sangre, en el caso de estar contaminadas por el VIH, se seguirían de la infección del receptor en más del 60%-95% de los casos. Desde 1985 se aplica la búsqueda sistemática de anticuerpos de VIH en todas las muestras de sangre para transfundir, el riesgo de infección se ha convertido en un riesgo teórico residual, tan sólo escaparían al control los hipotéticos casos de donantes que no se autoexcluyesen a pesar de sus prácticas de riesgo y que estuviesen en la fase de primoinfección, aún sin anticuerpos detectables en sangre (27).

ii.iii Transplantes

Los órganos vascularizados de un paciente infectado pueden transmitir la infección al receptor, (al menos 75 casos antes de 1985). Las muestras avascularizadas, liofilizadas o tratadas con alcohol (hueso, córneas, tendones, fascias), procedentes de donante infectado, no han transmitido la infección (28).

ii.iv Accidentes de inoculación de sangre contaminada en el medio laboral

Son un riesgo de infección muy pequeño (<0,3%), pero obligan a una alerta permanente. Ha sido difícil definir los factores de riesgo para la transmisión a través de mucosas o piel, dados los pocos casos descritos, pero la exposición a grandes volúmenes de sangre, o por tiempo prolongado, y la presencia de soluciones de continuidad en la piel o mucosas, parecen ser factores condicionantes (29).

iii. Transmisión perinatal o maternoinfantil

La transmisión puede producirse durante la gestación (6%), durante el parto (18%), y en el postparto a través de la leche materna (4%). Está demostrada la posibilidad de transmisión en el segundo trimestre de la gestación (hasta un 5% de infecciones). Actualmente, con el tratamiento antirretrovírico, la cesárea y la eliminación de la lactancia materna se han conseguido tasas de transmisión tan bajas como del 1,6% (30-32).

iv. Sobreinfección o superinfección.

Se han descrito casos de nuevas infecciones concomitantes por dos cepas diferentes de subtipos de VIH. La sobreinfección puede precipitar una rápida progresión de la enfermedad, lo que proporciona un nuevo argumento para insistir en la prevención frente a nuevas exposiciones entre los individuos ya infectados (33).

C. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Desde un punto de vista clínico-viroológico pueden distinguirse las siguientes fases evolutivas en la historia natural de la infección (34):

1. Fase precoz, aguda ó primoinfección

El virus se disemina rápidamente a través del organismo invadiendo múltiples órganos, principalmente los sistemas linfático y nervioso. A las 2-6 semanas de la inoculación la mayoría

de los pacientes tienen una carga viral muy elevada en el plasma, encontrándose infectados una gran proporción de los linfocitos CD4+, aparecen en ese momento los signos y síntomas del denominado síndrome retroviral agudo, se observa linfopenia transitoria. Entre las 4 y las 12 semanas desde la inoculación aparecen los diferentes tipos de anticuerpos contra el VIH y ocurre la correspondiente respuesta inmune celular específica, altamente eficaz para limitar la replicación vírica. La carga viral del VIH presente en este momento en la sangre constituye el principal factor pronóstico respecto a la probabilidad de progresión a sida a lo largo de los años siguientes (34,35).

2. Fase intermedia o crónica

Durante esta etapa persiste una elevada actividad replicativa viral que es contrarrestada por la impresionante capacidad de regeneración de los linfocitos CD4+. La carga viral en los órganos linfoides supera en 10-10.000 veces la circulante, con tendencia final a igualarse en ambos compartimentos (34).

3. Fase final o de crisis

En esta etapa se produce un incremento de la actividad replicativa del virus. Es probable que el sistema inmunológico sea ya incapaz de reponer los linfocitos CD4+ destruidos y, por lo tanto, que su capacidad para limitar la multiplicación del VIH se reduzca progresivamente (34).

D. CINÉTICA DE LA RESPUESTA INMUNE

1. Individuos infectados

La respuesta clonal de linfocitos CD8+ y la aparición de anticuerpos neutralizantes inducen una disminución importante de la viremia. En la fase crónica de la enfermedad las respuestas son intensas como consecuencia de la replicación crónica del virus que continúa estimulándolas. En los estadios finales, caracterizados por la aparición de infecciones oportunistas, se produce un descenso en el número de linfocitos CD4+, una disminución de la respuesta humoral y celular frente al VIH y una elevación de la carga viral. La disminución de los linfocitos CD4+ origina un deterioro de las actividades de las demás células involucradas en la respuesta inmune (21,35).

2. Pacientes progresores lentos

Son pacientes con carga viral inferior a 104 copias de ARN/ml, una cifra mantenida de linfocitos CD4+ y que progresan lentamente o no progresan a sida. En estos pacientes, los mecanismos efectores frente al virus son superiores respecto a los pacientes normales, lo que implica una replicación menos agresiva del virus. Algunos factores genéticos pueden estar involucrados en una progresión lenta de la enfermedad (33).

E. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH

El diagnóstico definitivo de la infección por el VIH sólo puede establecerse por métodos de laboratorio, ya que en ningún caso las manifestaciones clínicas son lo suficientemente específicas (36). En general, los métodos indirectos son suficientes para establecer un diagnóstico, sin embargo, la combinación de métodos directos con métodos indirectos, ha demostrado ser útil en el diagnóstico de la primoinfección o seroconversión reciente y en la infección perinatal, donde el uso de métodos indirectos es insuficiente (37).

La detección por métodos directos o indirectos del VIH ha permitido no solo reconocer a las personas infectadas y establecer medidas preventivas adecuadas, sino que además constituye una ayuda esencial en el seguimiento de los pacientes para conocer el pronóstico de la enfermedad y la eficacia del tratamiento utilizado. La metodología más frecuentemente utilizada es la indirecta, se debe realizar de forma voluntaria, informada, confidencial, asesorada y apoyada (36).

Las pruebas confirmatorias se caracterizan por su especificidad y permiten asegurar la positividad de una muestra previamente reactiva con un test de tamizaje ya que las muestras positivas en la prueba de tamizaje, aunque son de alta sensibilidad, requieren ser confirmadas con un test muy específico (38).

Es importante saber cómo cursa la enfermedad en el paciente infectado por el VIH, y tener en cuenta si se encuentra en la primera fase de la infección, en el periodo asintomático o en un momento más avanzado con sida. Según la fase de infección, unas técnicas de diagnóstico pueden tener mayor utilidad que otras. Así, durante la infección primaria o periodo ventana, los métodos directos son más útiles para saber si una persona está infectada. Pasada la infección

primaria y hasta el final de la enfermedad, se utiliza como método diagnóstico la prueba de determinación de anticuerpos frente al VIH (39).

1. Métodos directos

Los métodos directos detectan al propio virus o alguno de sus componentes, como proteínas o ácidos nucleicos, su uso para el diagnóstico es limitado especialmente en países en desarrollo debido a las condiciones necesarias para realizarlos y su alto costo (39). Incluyen:

i. Cultivo vírico

El método consiste en un cocultivo de células mononucleares de sangre periférica del paciente junto a otras del mismo tipo procedentes de donantes. El cultivo se considera positivo por la demostración del efecto citopático o la detección de productos víricos como el antígeno p24 o la transcriptasa inversa (37).

ii. Antigenemia p24

El antígeno p24 de la cápside del VIH (core), se detecta en suero o plasma mediante una reacción de EIA (enzyme immunoassay) o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), es un marcador precoz de infección aguda por VIH. A lo largo de la infección su detección es variable debido al incremento de anticuerpos anti-p24 neutralizantes o a la escasa replicación del virus (38).

iii. Detección molecular de ADN provírico y ARN vírico

Entre ellas se encuentran PCR, RT-PCR, ADN ramificado o bDNA y amplificación basada en la transcripción o TNA(NASBA) (38).

2. Métodos indirectos

Reconocen los anticuerpos específicos producidos por el sistema inmune como respuesta a la presencia del virus (39).

i. Pruebas de tamizaje serológicas

Son las más empleadas debido a su metodología relativamente simple, alta sensibilidad, nivel de automatización y diseño para realizar un gran número de pruebas de forma simultánea, son Técnicas inmunoenzimáticas (EIA) clasificadas por generaciones según sus principios y componentes: indirecto con antígeno obtenido de lisado vírico (primera generación), indirecto o competitivo con antígeno

obtenido de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos (segunda generación), tipo sándwich o de inmunocaptura, con antígeno obtenido de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos y detección conjunta de anticuerpos específicos de clase IgG, IgM e IgA (tercera generación), existen también los que permiten la detección combinada de anticuerpos específicos y antígeno de VIH (cuarta generación) (38).

ii. Pruebas confirmatorias

El Western Blot (WB) es el método recomendado para la confirmación de resultados y permite discriminar, por la aparición de bandas reactivas, frente a qué antígenos víricos se dirigen los anticuerpos presentes en la muestra. La interpretación del WB se puede realizar según diversos criterios aunque el más aceptado es el de la OMS que exige la presencia de al menos dos bandas de la envoltura. La muestra negativa implica una ausencia de bandas reactivas y cualquier situación intermedia se interpreta como reacción indeterminada (40). Un resultado indeterminado en WB obliga a un control del paciente y a la repetición de la determinación a los 3-6 meses siendo recomendable utilizar métodos de diagnóstico directo para resolver el problema (41). Una alternativa al WB es el inmunoensayo lineal (LIA), consistente en pegar a una tira de nitrocelulosa diversos antígenos del VIH. Su sensibilidad es similar al WB y presenta menos reacciones cruzadas por la presencia de productos celulares propios del proceso de fabricación de WB. Las técnicas de IFI y RIPA, debido a su subjetividad y complejidad técnica, respectivamente, no se consideran adecuadas para el uso rutinario como método confirmatorio (38).

iii. Otras técnicas

Existen otras pruebas de tamizaje caracterizadas por la obtención de resultados en menos de 30 minutos, por lo que se les llama pruebas rápidas. Son muy útiles aplicadas en situaciones que requieren un resultado inmediato, como trasplantes, accidentes laborales o antes del parto en una embarazada que no ha sido controlada con respecto a la infección por el VIH (41). Suele tratarse de técnicas en dot blot que, realizadas correctamente, ofrecen una gran seguridad en el resultado (42). Se utilizan también técnicas simples como la aglutinación (con hematíes, látex o

partículas de gelatina) que muestran una excelente sensibilidad y especificidad. En el caso de las técnicas inmunocromatográficas se requiere simplemente la adición de la muestra que reaccionará con los distintos reactivos al ser arrastrada por una solución tamponada en una tira de papel. Estas técnicas son simples de ejecución y no requieren instrumentación (43).

Las pruebas de tamizaje también pueden ser realizadas a partir de muestras de saliva y orina, para lo cual existen métodos adaptados, con la ventaja que supone sobre la muestra de suero en cuanto a facilidad en la obtención, menor riesgo de contagio accidental y coste económico (44).

F. IMPORTANCIA DE LAS PRUEBAS RÁPIDAS

Debido a la rápida expansión de la epidemia, el serodiagnóstico del VIH basado en la prueba rápida es una alternativa valiosa en la introducción de programas de prevención y vigilancia del VIH en todas las áreas, principalmente donde los recursos son limitados y es difícil establecer laboratorios sofisticados (45,46).

La mayoría de las pruebas rápidas presentan un valor predictivo negativo muy cercano al 100%, lo que evita la realización de pruebas suplementarias para confirmar resultados negativos y un valor predictivo positivo alrededor de 98%, y de la misma forma cuando los resultados son indeterminados o no específicos es necesario realizar pruebas confirmatorias (7,42). Esta situación ha permitido el amplio uso de este tipo de pruebas en diferentes áreas de diagnóstico de VIH y la modificación de los algoritmos diagnósticos en muchos casos, principalmente en las salas de labor y parto y en las campañas masivas de detección (47,48).

Se ha comprobado la validez de la prueba rápida Determine HIV1/2 en la CFLAG y se obtuvo sensibilidad de 100% y especificidad de 99.5% con VPP de 98% y VPN de 100%, por ser iguales estos porcentajes a los valores del estándar de oro (ELISA), la prueba rápida puede sustituirla como prueba de tamizaje (7,49). En otro estudio en el Hospital General San Juan de Dios (HGSD), se compararon dos pruebas rápidas (D.I.A. VIH 1+2 y Determine HIV1/2 encontrándose sensibilidad relativa entre 88.9% y 100% y especificidad aceptable entre 99.7% y 100%, los Valores predictivos fueron 88.9-100%(VPP) y 99,7-100%(VPN), las pruebas tuvieron concordancia perfecta y óptima respectivamente (50).

1. Determinación de la exactitud y fiabilidad de las pruebas rápidas.

La exactitud de las pruebas rápidas se determina por medio de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), en cuanto a su fiabilidad, esta se determina por medio de la concordancia (57).

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 las personas con resultado negativo respectivamente (5). La concordancia expresa la fiabilidad o buena repetibilidad de una prueba (57).

La exactitud y consistencia interna de los datos es verificada a través del programa check file del paquete epidemiológico EpiInfo 6.0. Todos los análisis se efectúan en este mismo programa e incluyen: validez con la estimación de sensibilidad y especificidad relativa, fiabilidad de las pruebas a través de la concordancia entre la prueba rápida y la prueba Determine que se utilizó como estándar de oro relativo. En todos los cálculos se utilizan las fórmulas convencionales a un nivel de confianza del 95%.

2. Prueba rápida DoubleCheck™ HIV 1 & 2 (Orgenics)

La prueba rápida DoubleCheck™ HIV 1 & 2 es una prueba de tamizaje en forma de cassette utilizada para la detección cualitativa de anticuerpos del virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2) en suero o plasma. Esta prueba es un inmunoensayo rápido de un solo uso basado en la detección específica de anticuerpos anti-VIH por medio de inmunocromatografía. Se encuentra disponible en kits de 20 o 100 pruebas y cada kit contiene las pruebas empacadas individualmente, un inserto de la casa comercial y un gotero con búfer. Para su utilización es necesario contar con temporizador o cronómetro y pipeta de precisión con puntas desechables con capacidad para dispensar 10ul. Su temperatura de almacenamiento debe ser entre 2 y 30°C (51).

Las proteínas envoltura y gag de VIH-1 y VIH-2 son inmovilizadas en la región de prueba de la tira de nitrocelulosa y un agente bioquímico que reconoce anticuerpos humanos es dispersado en la región de control de la tira. Proteínas de VIH-1 y VIH-2 unidas a oro coloidal están impregnadas a la almohadilla de oro entre la almohadilla de prueba y la tira de

nitrocelulosa. Los complejos de anticuerpos de proteínas VIH-oro coloidal se desplazan por cromatografía a lo largo de la membrana nitrocelulosa hacia las regiones de prueba y control de dispositivo de la prueba (52).

Las pruebas pueden realizarse en suero o plasma frescos o muestras a temperatura ambiente que hayan sido almacenadas por 7 días entre 2 y 8°C o congeladas a -20°C y mezcladas antes de su uso (52).

El ensayo se realiza mediante la aplicación de 10uL de la muestra en el puerto de la muestra del dispositivo, posteriormente se aplican dos gotas de reactivo de lavado que facilitan el flujo de la muestra dentro del dispositivo y sobre la tira de análisis. Anticuerpos específicos para las proteínas del VIH-1 o VIH-2 reaccionarán con partículas del conjugado de oro coloidal (52).

Los resultados deben leerse al finalizar un período de incubación de 15 minutos o antes de transcurridos 25 minutos de la aplicación de la muestra. Para confirmar el funcionamiento adecuado de la prueba y demostrar que los resultados son válidos, la línea de control debe aparecer en todos los dispositivos, se considera un resultado positivo cuando aparecen dos líneas rosa/rojo (control interno y test), negativo cuando solo aparece una (control interno), debe sospecharse de las líneas con colores tenues que representen una reacción indeterminada o no específica e investigarse más a fondo para averiguar si es así (52).

En la evaluación realizada por la OMS de dos lotes de la prueba se informa sensibilidad de 99,4% y 100% y especificidad del 95,6% y 94,6%. Según un estudio multicéntrico en 6 lugares que incluyó 1285 pacientes infectados y 2518 donantes de sangre VIH negativos se reporta sensibilidad 99.9% y especificidad 99.6% en suero y plasma (53).

3. Prueba rápida HIV1/2 STAT-PAK[®] DIPSTICK (Chembio)

La prueba rápida HIV 1/2 STAT-PAK DIPSTICK es de un solo uso, cualitativa, basada en selección inmunocromatográfica la cual utiliza una combinación de antígenos para detectar anticuerpos del HIV 1 y 2 en suero, plasma y sangre completa. Se encuentra disponible en kits de 30 pruebas y cada kit contiene las tiras en un recipiente, un inserto de la casa comercial, un gotero con búfer, asas descartables calibradas de 5ul. Para su utilización es necesario contar con temporizador o cronómetro. Su temperatura de almacenamiento debe ser entre 8 y 30°C.

Resultados reactivos son de evidencia de la exposición al VIH y pueden ser utilizados para respaldar el diagnóstico clínico de VIH-1 o VIH-2. Resultados no reactivos, no deben ser utilizados para excluir la infección con VIH 1 y 2 (51).

Una combinación de anticuerpos unidos a proteínas es conjugada con partículas coloidales de tinción, y antígenos de VIH 1 y 2, los cuales están unidos a la membrana de la fase sólida cuando la muestra y el búfer son agregados a la tira, el búfer facilita el fluido lateral de la muestra a través de la membrana y promueve la unión de antígenos con anticuerpos. Si los anticuerpos contra VIH-1 o VIH-2 están presentes, se unen a la combinación de anticuerpo-proteína-oro coloidal, en la muestra, el complejo migra en la membrana de nitrocelulosa y es capturado por antígenos inmovilizados en el área del test, la muestra continúa migrando a lo largo de la membrana y produce una coloración rosa/púrpura en el área de control que contiene antígenos de inmunoglobulina G. El procedimiento de control ayuda a demostrar que la muestra y el reactivo han sido aplicados adecuadamente y han migrado a través del dispositivo (54).

Las pruebas pueden realizarse en suero o plasma frescos o muestras a temperatura ambiente que hayan sido almacenadas por 7 días entre 2 y 8°C o congeladas a -20°C y mezcladas antes de su uso y en sangre completa con anticoagulante o proveniente de sangre capilar (54).

El ensayo se realiza mediante la aplicación de la muestra con el asa en la almohadilla de la tira, posteriormente se aplican tres gotas de reactivo búfer que facilitan el flujo de la muestra sobre la tira de análisis. Anticuerpos específicos para las proteínas del VIH-1 o VIH-2 reaccionarán con partículas del conjugado de oro coloidal (54).

Los resultados deben leerse al finalizar un período de incubación de 15 minutos o antes de transcurridos 20 minutos de la aplicación de la muestra. Para confirmar el funcionamiento adecuado de la prueba y demostrar que los resultados son válidos, la línea de control debe aparecer en todos los dispositivos, se considera un resultado positivo cuando aparecen dos líneas rosa/púrpura (control interno y test), negativo cuando solo aparece una (control interno), debe sospecharse de las líneas con colores tenues que representen una reacción indeterminada o no específica e investigarse más a fondo para averiguar si es así (54).

En una evaluación de 770 muestras realizada por la OMS, se demostró sensibilidad de 99,0 por ciento y especificidad del 100 por ciento en comparación con los ensayos de referencia. Evaluaciones en Zambia, con 236 ejemplares, en Uganda con 503 ejemplares y, más recientemente, en el República de Sudáfrica, con 500 ejemplares de cada resultado en 100 por

ciento de sensibilidad y 100 por ciento de especificidad. Hay dos versiones del kit de prueba (53).

4. Prueba rápida RETROCHECK-HIV (Qualpro Diagnostics)

La prueba rápida RETROCHECK-HIV es de un solo uso, cualitativa para la detección de anticuerpos contra VIH 1 y 2 en suero, plasma y sangre completa. Es una prueba que utiliza un ensayo inmunocromatográfico tipo sándwich de flujo lateral. Debido a su simplicidad puede realizarse por cualquier persona. No se necesita equipo especializado o entrenamiento para leer el resultado. Se encuentra disponible en kits de 1, 10, 25, 50 y 100 pruebas y cada kit contiene las pruebas empacadas individualmente con pipeta desechable, un inserto de la casa comercial, un gotero con búfer. Para su utilización es necesario contar con temporizador o cronómetro. Su temperatura de almacenamiento debe ser entre 4 y 30°C.

Resultados reactivos son de evidencia de la exposición al HIV y puede ser utilizada para respaldar el diagnóstico clínico de HIV-1 o HIV-2. Resultados no reactivos, no deben ser utilizados para excluir la infección con HIV 1 y 2 (55).

El montaje de la membrana comprende antígenos recombinantes en la región T altamente purificados de antígeno gp 41, recombinado de p24 con péptido sintético O específico que representa VIH-1 y gp 36 específicos conjugados con oro coloidal, y antisuero en la región C. El antígeno recombinante corre por la membrana en la región de prueba y lucha contra el antisuero de conejo en la región de control, que sirve para validar la prueba. La muestra fluye y también el color a través de la membrana en el dispositivo y si existen anticuerpos, quedan inmovilizados dando lugar a una coloración en el área de la prueba (55).

Las pruebas pueden realizarse en suero o plasma frescos o muestras a temperatura ambiente que hayan sido almacenadas por 7 días entre 2 y 8°C o congeladas a -20°C y mezcladas antes de su uso y en sangre completa con anticoagulante (55).

El ensayo se realiza mediante la aplicación de dos gotas con la pipeta descartable de la muestra, posteriormente se aplican cinco gotas de reactivo búfer que facilitan el flujo de la muestra sobre la tira de análisis. Anticuerpos específicos para las proteínas del VIH-1 o VIH-2 reaccionarán con partículas del conjugado de oro coloidal (55).

Los resultados deben leerse al finalizar un período de incubación de 15 minutos o antes de transcurridos 30 minutos de la aplicación de la muestra. Para confirmar el funcionamiento

adecuado de la prueba y demostrar que los resultados son válidos, la línea de control debe aparecer en todos los dispositivos, se considera un resultado positivo cuando aparecen dos líneas rosa/púrpura (control interno y test), negativo cuando solo aparece una (control interno), debe sospecharse de las líneas con colores tenues que representen una reacción indeterminada o no específica e investigarse más a fondo para averiguar si es así (54).

Se corrieron 1204 muestras en dos centros de transfusión sanguínea europeos, de donde se determinó especificidad de 99.75% y con 500 muestras positivas se encontró sensibilidad de 100%.

5. Prueba rápida Colloidal gold (Kehua Bioengineering)

La prueba rápida coloidal gold (KHB) es una prueba de un solo uso y lectura visual para la determinación de anticuerpos contra VIH-1 y VIH-2 en suero, plasma o sangre humana, con fundamento de tecnología de fase sólida para inmuocromatografía. Se encuentra disponible en kits de 50 pruebas y cada kit contiene las pruebas empacadas individualmente, un inserto de la casa comercial y un gotero con búfer. Para su utilización es necesario contar con temporizador o cronómetro y pipeta de precisión con puntas desechables con capacidad para dispensar 40ul. Su temperatura de almacenamiento debe ser entre 2 y 30°C (56).

Las proteínas de VIH-1 y VIH-2 son inmovilizadas en la región de prueba de la tira de nitrocelulosa y un agente bioquímico que reconoce anticuerpos humanos es dispersado en la región de control de la tira. Proteínas gp160 y gp36 unidas a oro coloidal están impregnadas a la almohadilla de oro entre la almohadilla de prueba y la tira de nitrocelulosa. Los complejos de anticuerpos de proteínas VIH-oro coloidal se desplazan por cromatografía a lo largo de la membrana nitrocelulosa hacia las regiones de prueba y control de dispositivo (56).

Las pruebas pueden realizarse en suero o plasma frescos o muestras a temperatura ambiente que hayan sido almacenadas por 7 días entre 2 y 8°C o congeladas a -20°C y mezcladas antes de su uso o sangre completa anticoagulada o capilar (56).

El ensayo se realiza mediante la aplicación de 40uL de la muestra en el puerto de la muestra del dispositivo, posteriormente se aplica una gota de reactivo de lavado que facilita el flujo de la muestra dentro del dispositivo y sobre la tira de análisis. Anticuerpos específicos para las proteínas del VIH-1 o VIH-2 reaccionarán con partículas del conjugado de oro coloidal (56).

Los resultados deben leerse al finalizar un período de incubación de 2 a 3 minutos o antes de transcurridos 30 minutos de la aplicación de la muestra. Para confirmar el funcionamiento adecuado de la prueba y demostrar que los resultados son válidos, la línea de control debe aparecer en todos los dispositivos, se considera un resultado positivo cuando aparecen dos líneas rosa/rojo (control interno y test), negativo cuando solo aparece una (control interno), debe sospecharse de las líneas con colores tenues que representen una reacción indeterminada o no específica e investigarse más a fondo para averiguar si es así (56).

Los resultados de las pruebas en muestras de CDC de Shanghai fueron comparados con resultados de Determine HIV 1/2 encontrando concordancia ideal entre ambas pruebas, se hizo una comparación con resultados de ELISAS con 583 muestras del centro de transfusión sanguínea de Beijing encontrándose sensibilidad de 99.2% y 100% de especificidad (56).

IV. JUSTIFICACIÓN

Las pruebas serológicas para detectar la presencia de anticuerpos contra VIH desempeñan un papel cada vez más importante en los esfuerzos para hacer frente a la epidemia mundial de sida. Con el constante crecimiento de los programas para la prevención de la transmisión de madre a hijo, de persona a persona, la seguridad de la sangre y el acceso a la terapia, estas pruebas son herramientas esenciales para el diagnóstico. Se estima que 100 millones de personas tendrán que ser analizadas anualmente para alcanzar los objetivos de las últimas grandes iniciativas en VIH/sida. Algunas de estas pruebas se realizarán mediante algún inmunoensayo enzimático, pero en muchas situaciones y principalmente en países en desarrollo como Guatemala, las pruebas de diagnóstico rápido para el VIH serán más eficaces y quizá, las únicas accesibles, para proporcionar información sobre el estatus de VIH.

A pesar de los avances logrados en el desarrollo de estas pruebas, se siguen produciendo casos de falsos positivos y falsos negativos, situaciones que generan ansiedad en los pacientes y desconcierto en los profesionales encargados de dicho diagnóstico, atribuibles al enorme crecimiento de esta demanda analítica dentro de la asistencia clínica.

Ante la importancia que han tomado este tipo de pruebas, todos los laboratorios que realizan pruebas de VIH, deben escogerlas tomando en cuenta diversos factores operativos, sin embargo 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 utilizadas para el diagnóstico de la infección por el VIH es muy importante el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN), indicadores que dependen de la prevalencia de la infección en la población, situación que genera la necesidad de conocer el comportamiento de las pruebas respecto a la población a la que se van a aplicar.

Estos dispositivos de un solo uso, presentan grandes ventajas frente a las pruebas ELISA generalmente utilizadas para diagnóstico de VIH, entre ellas, tiempo en el que se obtiene el resultado que es corto, equipo mínimo que se requiere para realizarlas, gran variedad de muestras que pueden utilizarse, las pueden realizar personas sin formación formal de laboratorio, poco volumen de muestra necesario, situación que contribuye a que se disponga de muestra residual con la que se puedan comprobar o repetir los resultados por los métodos tradicionales, buena sensibilidad y especificidad y bajo costo, su uso debe ser cuidadosamente aplicado y solamente después de conocerse el comportamiento de la prueba en la población en la que va a usarse.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Estimar la exactitud y fiabilidad de las pruebas rápidas Dipstick HIV1/2 STAT-PAK™ (Chembio), Doublecheck™ HIV 1&2 (Orgenics), Retrocheck-HIV™ (Qualpro Diagnostics), y Colloidal Gold™ (Kehua Bioengineering) para el tamizaje de la infección por VIH en usuarios de un hospital urbano con respecto al estándar de oro relativo, la prueba rápida Determine HIV1/2 (Inverness).

B. Objetivos específicos

- i. Determinar la exactitud por medio de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de las pruebas rápidas Dipstick HIV1/2 STAT-PAK™ (Chembio), Doublecheck™ HIV 1&2 (Orgenics), Retrocheck-HIV™ (Qualpro Diagnostics), y Colloidal Gold™ (Kehua Bioengineering) con respecto al estándar de oro relativo, la prueba Determine HIV 1/2. (Inverness).
- ii. Evaluar la fiabilidad por medio de concordancia de las pruebas rápidas Dipstick HIV1/2 STAT-PAK™ (Chembio), Doublecheck™ HIV 1&2 (Orgenics), Retrocheck-HIV™ (Qualpro Diagnostics), y Colloidal Gold™ (Kehua Bioengineering) con respecto al estándar de oro relativo, la prueba Determine HIV 1/2. (Inverness).

VI. HIPÓTESIS

Por ser una evaluación con fines descriptivos, durante el estudio no se describió hipótesis.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de Trabajo

Se determinó la exactitud y fiabilidad de las pruebas rápidas Dipstick HIV1/2 STAT-PAK™ (Chembio), Doublecheck™ HIV 1&2 (Orgenics), Retrocheck-HIV™ (Qualpro Diagnostics), y Colloidal Gold™ (Kehua Bioengineering) en sueros de usuarios de la Clínica Familiar “Luis Ángel García”, Asociación de Salud Integral y Hospital General San Juan de Dios para la determinación de la infección por VIH.

B. Muestra

Se obtuvieron 2,504 muestras de suero, 1,621 de mujeres embarazadas (baja prevalencia) y 882 de usuarios de la consulta externa de la CFLAG (alta prevalencia). Aunque el cálculo de muestra con Epidat 3.0 para la baja prevalencia (0.3%) de infección en la población con una sensibilidad esperada de 99%, un nivel de confianza de 95% y precisión del 95% sugiere 334 muestras y para la alta prevalencia 136, se tuvo a disposición mayor cantidad de reactivo, por lo que se realizaron para este estudio diferentes cantidades de muestras para cada prueba evaluada en las dos poblaciones.

C. Recursos

1. Recursos Humanos

MSPH, DrPH candidata Blanca Samayoa Herrera, Asesora

Licda. Tamara Velásquez Porta, Asesora

Br. María Mercedes Mazariegos, Seminarista

Br. Adriana Celeste Picón Choc, Seminarista

2. Recursos institucionales

Laboratorio Clínico ASI

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

Emergencia de ginecología del Hospital General San Juan de Dios

Consulta externa de maternidad, Hospital General San Juan de Dios
Programa Nacional de sida (PNS).

3. Recursos económicos

Las pruebas para esta investigación fueron obtenidas de donaciones del Programa Nacional de sida, los demás recursos materiales los proporcionó la Asociación de Salud Integral (ASI).

4. Recursos Materiales

a. Reactivos de laboratorio

2,009 pruebas DoubleCheck™ HIV 1 & 2 (Orgenics)

1,948 pruebas Retrocheck-HIV™ (Qualpro Diagnostics)

1,490 pruebas HIV1/2 STAT-PAK® Dipstick (Chembio)

1,782 pruebas Colloidal Gold™ (Kehua Bioengineering)

b. Insumos

8,000 Tubos Eppendorff

Algodón y alcohol

Cuaderno empastado

Guantes desechables

Lentes de bioseguridad

Bata de laboratorio

Marcador indeleble

8,000 Tips

c. Equipo

Computadora con software Epi INFO 3.4.3(WHO) y Epi 6

Congelador

Centrifugadora

Pipeta automatizada

D. Metodología

Fase I: Obtención y proceso de muestras

- i. Se utilizaron 2,504 muestras de suero, las cuales fueron obtenidas de 882 pacientes que acudieron a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” (internos del hospital y ambulatorios), 1,621 mujeres embarazadas (consulta externa y emergencia de ginecología) que se realizaron la prueba de anticuerpos contra VIH.
- ii. A las 2,504 pruebas obtenidas se les realizaron las pruebas rápidas:
 - ii.i Retrocheck: Luego de verificar la integridad del empaque y de la prueba, se colocó el código de la muestra con marcador sobre el área indicada para la identificación, con la pipeta de forma vertical se aplicaron dos gotas de suero en el espacio A de la prueba y en el espacio B se colocaron 5 gotas del búfer, se leyeron y anotaron los resultados entre 15 y 30 minutos después de haber colocado el búfer.
 - ii.ii DoubleCheck: Luego de verificar la integridad del empaque y de la prueba, se colocó el código de la muestra con marcador sobre el área indicada para la identificación, con la pipeta automática se aplicaron 10ul de suero al centro del pocillo de la prueba e inmediatamente se colocaron 2 gotas del búfer, se leyeron y anotaron los resultados entre 15 y 30 minutos después de haber colocado el búfer.
 - ii.iii Dipstick: Luego de verificar la integridad del empaque y de la prueba, se colocó la prueba sobre la base plástica sobre la que se colocó el código de la muestra con marcador sobre el área indicada para la identificación, con el asa calibrada desechable de la prueba se tomaron 5ul de suero y de forma vertical se aplicó sobre la almohadilla en la misma, se colocaron 3 gotas del búfer, se leyeron y anotaron los resultados entre 15 y 30 minutos de haber colocado el búfer.
 - ii.iv Colloidal Gold: Luego de verificar la integridad del empaque y de la prueba, se colocó el código de la muestra con marcador sobre el área indicada para la identificación, con la pipeta automática se aplicaron 40ul de suero al

centro del pocillo de la prueba e inmediatamente se colocaron 1 gota del búfer, se leyeron y anotaron los resultados entre 2-3 minutos después de haber colocado el búfer.

Fase II: Control de calidad

- ii. Todas las pruebas contenían un control de calidad inherente, si no aparecía el control al correr la prueba, la prueba se consideró inválida y se repitió.
- iii. Se le utilizó como control de calidad la prueba ELISA Vironostika HIV uniform II Ag/Ab en algunas muestras negativas, y en todas las positivas y discordantes con Determine HIV1/2(Inverness).

Fase III: Análisis Estadístico

- i. Tipo de estudio. Evaluación de test diagnóstico
- ii. La exactitud y consistencia interna de los datos fue verificada a través del programa check file del paquete epidemiológico EpiInfo 6.0. Todos los análisis se efectuaron en este mismo programa e incluyeron: validez con la estimación de sensibilidad y especificidad relativa, fiabilidad de las pruebas a través de la concordancia entre la prueba rápida y la prueba Determine que se utilizó como estándar de oro relativo. En todos los cálculos se utilizaron las fórmulas convencionales a un nivel de confianza del 95%.

VIII. AVAL DE LA INSTANCIA OFERENTE

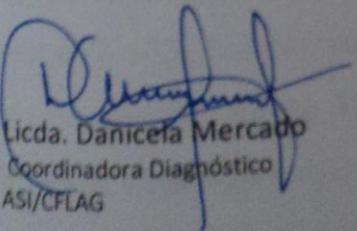


**Asociación de Salud Integral –ASI-
Clínica Familiar “Luis Ángel García”
2 da. Avenida 11-53 zona 1, Ciudad de Guatemala
PBX: (502)2311-8100
e-mail: info@aidsguatemala.com
www.aidsguatemala.com**

Guatemala, 8 de noviembre de 2011

A quien interese:

Por este medio nos permitimos avalar la publicación de los resultados obtenidos en el Seminario de Investigación S13-08 Evaluación de cuatro pruebas rápidas para tamizaje de la infección por VIH en pacientes que acuden a la Clínica Familiar “Luis Ángel García”, según el informe final presentado por María Mercedes Mazariegos Maldonado y Adriana Celeste Picón Choc.



Licda. Danicela Mercado
Coordinadora Diagnóstico
ASI/CFLAG

ASOCIACION DE SALUD INTEGRAL
2a. Avenida 11-53, Zona 1 - Guatemala Guatemala
Teléfono: 2311-8100 - Fax: 2311-8103
E-mail: asi@aidsguatemala.com

IX. RESULTADOS

Durante un periodo de tres meses, se procesó una muestra consistente en 2,504 muestras de suero. Para la misma 1,621 (64.7%) de las muestras provenían de una población con baja prevalencia (0.3%) y 882 (35.3%) de población con alta prevalencia (10.0%) de infección por VIH. En total se realizaron 9,732 pruebas durante el estudio distribuidas según la cantidad de reactivo disponible.

En la Tabla 1 se describen los resultados (N=9,732) observados en ambas poblaciones. Del total de pruebas evaluadas se observaron 410 (4.2%) pruebas con resultados positivos y 66 (0.7%) indeterminados. De estas 33 (50.0%) se procesaron a través de las pruebas diagnósticas Retrocheck y 14 (21.2%) Dipstick.

Tabla 1. Resultados globales observados con las pruebas para tamizaje de VIH evaluadas con respecto al estándar de oro relativo(N=9,732)

Prueba	Total ¹	Positivo		Negativo		Indeterminado	
	n	n	%	n	%	n	%
Determine HIV 1/2™	2503	103	4.11	2395	95.68	5	0.19
HIV 1/2Dipstick™	1490	66	4.43	1410	94.63	14	0.94
Doublecheck HIV 1&2™	2009	89	4.43	1913	95.22	7	0.35
Colloidal Gold™	1782	66	3.70	1709	95.90	7	0.39
Retrocheck HIV™	1948	86	4.41	1829	93.89	33	1.69
Total	9732	410	4.21	9256	95.10	66	0.67

¹Total de pruebas realizadas por reactivo. Fuente: Datos Experimentales

En la Tabla 2 se muestra el análisis de los resultados globales. Para esto, los mismos fueron estratificados, por prevalencia de la infección por VIH, en dos grupos: 1) poblaciones con baja prevalencia (0.3%) y alta prevalencia (10.0%). Las pruebas con resultados indeterminados fueron descartadas para este análisis. Las 7,155 pruebas efectuadas fueron comparadas con el estándar de oro relativo¹. En la población con baja prevalencia (n=4,445), para Dipstick² se observaron 3 (0.32%) resultados positivos, para Colloidal Gold³ 3(0.25%), Retrocheck⁴ 3 (0.34%), y para la prueba Doublecheck⁵ 4 (0.33%). Para las pruebas realizadas con el test Retrocheck se observaron 6(0.51%) resultados falsos positivos. Para Colloidal Gold y Retrocheck se observó una prueba con resultado falso negativo. En población con alta prevalencia (n=2,710),

¹ Prueba rápida Determine HIV 1/2 (Inverness), ² Prueba rápida HIV 1/2 STAT PAK[®] DIPSTICK (Chembio), ³ Prueba rápida Colloidal Gold (Kehua Bioengineering), ⁴ Prueba rápida Retrocheck HIV (Qualpro Diagnostics), ⁵ Prueba rápida Doublecheck™ HIV 1&2 (Organics).

para las pruebas Dipstick y Colloidal Gold se observaron 62 (6.71% y 5.31% respectivamente) resultados positivos, para Doublecheck 84 (7.03%) y con la prueba Retrocheck 76 (6.48%). En la prueba Dipstick se observó 1 (0.1%) falso positivo igual que en las pruebas Doublecheck y Retrocheck (0.08%). Para la prueba Dipstick se observó 1 (0.1%) resultado falso negativo asimismo para Doublecheck y Colloidal 1 (0.09%), mientras que para Retrocheck se observaron 2 (0.17%).

Tabla 2. Comparación global de los resultados de las pruebas rápidas evaluadas para tamizaje de VIH y el estándar de oro relativo por tipo de población (N=7,155)

Prueba	Positivo n(%)	Negativo n(%)	Falso positivo n(%)	Falso negativo n(%)	Total n
Baja prevalencia (0.3%)					
HIV 1/2Dipstick™	3(0.32)	910(94.67)	0(0.00)	0(0.00)	913
Doublecheck HIV 1&2™	4(0.33)	1190(99.66)	0(0.00)	0(0.00)	1194
Colloidal Gold™	3(0.25)	1162(99.65)	0(0.00)	1(0.09)	1166
Retrocheck HIV™	3(0.34)	1162(99.14)	6(0.51)	1(0.08)	1172
Total					4445
Alta prevalencia (10.0%)					
HIV 1/2Dipstick™	62(11.25)	495(88.55)	1(0.10)	1(0.10)	559
Doublecheck HIV 1&2™	84(10.53)	719(89.31)	1(0.08)	1(0.08)	805
Colloidal Gold™	62(10.30)	544(89.62)	0(0.00)	1(0.08)	607
Retrocheck HIV™	76(10.45)	660(89.30)	1(0.08)	2(0.17)	739
Total					2710
Pruebas comparadas¹					7155

¹Total de pruebas comparadas con el estándar de oro relativo. Fuente: Datos experimentales

Luego del análisis anterior se procedió a la evaluación de los resultados en cuanto a exactitud y fiabilidad. Para la exactitud y fiabilidad en comparación al estándar de oro relativo, para cada prueba incluyeron los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN). Mientras que la fiabilidad se determinó a través de la concordancia con la estimación del índice Kappa. Los resultados para la población con baja y alta prevalencia, se describen en la Tabla 3 y 4 respectivamente.

Para la población con baja prevalencia, (Tabla 3) se observa que los parámetros de exactitud en las pruebas Doublecheck, Dipstick y Colloidal Gold fueron similares, sensibilidad y especificidad (99.9%), todas con intervalos de confianza amplios en la sensibilidad y estrechos en la especificidad. El VPP para las pruebas Dipstick y Doublecheck fue 99.9%, mientras que para Colloidal Gold fue 75.0%, todos con intervalos de confianza amplios. El VPN para

Doublecheck, Dipstick y Colloidal Gold fue 99.9% con intervalos de confianza estrechos. La única prueba en la que se observaron resultados de los parámetros de exactitud diferentes a las anteriores fue Retrocheck, en la misma se observó sensibilidad de 75.0% (IC_{95%}=21.9-98.7), especificidad de 99.5% (IC_{95%}=98.8-99.8), VPP 33.33% (IC_{95%}=9.0-69.1) y VPN 99.5% (IC_{95%}=99.4-100.0). Sin embargo, la concordancia (índice *Kappa*) comparada con los resultados del estándar de oro relativo para Dipstick y Doublecheck fue 1.00 y para Colloidal Gold y Retrocheck 0.99.

Tabla 3. Evaluación de la exactitud y fiabilidad de las pruebas en estudio para la población de baja prevalencia

Prueba	Sensibilidad		Especificidad		VPP ¹		VPN ² % (IC)		k ³
	%	(IC)	%	(IC)	%	(IC)	%	(IC)	
HIV 1/2 Dipstick TM	99.9	(31.0-100.0)	99.9	(99.5-100.0)	99.9	(31.0-100.0)	99.9	(99.5-100.0)	1.0
Doublecheck HIV1/2 TM	99.9	(39.6-100.0)	99.9	(99.6-100.0)	99.9	(39.6-100.0)	99.9	(99.6-100.0)	1.0
Colloidal Gold TM	99.9	(31.0-100.0)	99.9	(99.4-100.0)	75.0	(21.9-98.7)	99.9	(99.6-100.0)	0.99
Retrocheck HIV TM	75.0	(21.9-98.7)	99.5	(98.8-99.8)	33.3	(9.0-69.1)	99.5	(99.4-100.0)	0.99

Exactitud al 95% mediante análisis chi cuadrado y fiabilidad por concordancia con índice Kappa al 95%. ¹VPP: valor predictivo positivo. ²VPN: valor predictivo negativo ³k: Índice Kappa.

Para todas las pruebas evaluadas en la población con alta prevalencia se observaron resultados similares en cuanto a exactitud y fiabilidad que se describen en la Tabla 4. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para todas las pruebas evaluadas en dicha población fue arriba de 97.4% con intervalos de confianza estrechos. La concordancia (índice Kappa) comparada con los resultados del estándar de oro relativo para todas las pruebas evaluadas fue 0.99.

Tabla 4. Evaluación de la exactitud y fiabilidad de las pruebas en estudio para la población de alta prevalencia.

	Sensibilidad		Especificidad		VPP ¹		VPN ²		K ³
	%	(IC)	%	(IC)	%	(IC)	%	(IC)	
HIV 1/2 Dipstick TM	98.4	(90.3-99.9)	99.8	(98.7-100.0)	98.4	(90.3-99.9)	99.8	(98.7-100.0)	0.99
Doublecheck HIV1/2 TM	98.8	(92.7-99.9)	99.9	(99.7-100.0)	98.8	(92.7-99.9)	99.9	(99.1-100.0)	0.99
Colloidal Gold TM	98.4	(90.3-99.9)	99.9	(99.1-100.0)	99.9	(92.7-100.0)	99.8	(98.7-100.0)	0.99
Retrocheck HIV TM	97.4	(90.2-99.6)	99.8	(99.0-100.0)	98.7	(92.0-99.9)	99.7	(90.8-99.9)	0.99

Exactitud al 95% mediante análisis chi cuadrado y fiabilidad por concordancia con índice Kappa al 95%. ¹VPP: valor predictivo positivo ²VPN: valor predictivo negativo. ³k: Índice Kappa.

En la Tabla 5 se describen algunas de las características técnicas y operacionales de las pruebas evaluadas determinantes del desempeño en el laboratorio. Entre las características de importancia para la evaluación se observó que todas las pruebas tuvieron variabilidad en la intensidad del color de las bandas, el tiempo de observación fue diferente para Colloidal Gold (3 minutos). La agilidad de ejecución y facilidad del procedimiento fueron complejas solo para la prueba Dipstick. Para todas las pruebas se utilizó suero, y todas tenían un espacio destinado a la identificación de muestra y principio inmunocromatográfico.

Tabla 5. Desempeño técnico y operacional en el laboratorio de las pruebas evaluadas para tamizaje de VIH en población de alta y baja prevalencia

Características	Prueba			
	HIV 1/2 Dipstick ^{TM1}	Doublecheck HIV1/2 ^{TM2}	Colloidal Gold ^{TM3}	Retrocheck HIV ^{TM4}
Visualización de resultados	Bandas completas, variación de intensidad de color.	Bandas completas y difusas, sin variación de intensidad del color.	Bandas completas, sin variación de intensidad del color	Bandas completas y difusas, con variación de intensidad del color.
Tiempo	15 min/ prueba	15 min/prueba	3 min/prueba	15 min/ prueba
Agilidad de ejecución	Complejo, no necesita medir la muestra ya que el kit trae un asa calibrada, pero debe prepararse la tira pegándola sobre la base, éste procedimiento puede dañar o contaminar la tira.	Muy buena, es necesario contar con pipeta automatizada y puntas para servir la muestra.	Muy buena, es necesario contar con pipeta automatizada y puntas para servir la muestra.	Sencillo, no necesita medición de muestra, el kit trae su búfer preparado y micropipeta desechable para servir la muestra.
Facilidad del procedimiento	Mala, debe prepararse de la tira para el análisis, materiales empacados por separado.	Buena, empacada individualmente.	Buena, empacada individualmente	Excelente, empaque individual, con todos sus materiales.

Fuente: Datos experimentales.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el objetivo de estimar la exactitud y fiabilidad de las pruebas rápidas HIV 1/2 Dipstick™, Doublecheck HIV 1&2™, Colloidal Gold™ y Retrocheck HIV™ para su uso en el tamizaje de la infección por VIH se compararon los resultados de las pruebas con el estándar de oro relativo, la prueba rápida Determine HIV1/2™.

La evaluación de exactitud incluyó la determinación de la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para las dos poblaciones estudiadas mientras que la fiabilidad se determinó a través de la concordancia con la estimación del índice Kappa para las poblaciones de baja (0.3%) y alta prevalencia (10%) de infección por VIH.

En cuanto a la población con baja prevalencia de VIH (Tabla 3), para la sensibilidad estimada de las pruebas Doublecheck, Dipstick y Colloidal Gold (99.9%) se observaron intervalos de confianza amplios. Los intervalos de confianza amplios para esta población sugirieron la necesidad de evaluar las pruebas con mayor cantidad de muestras, ya que se encontraron pocos resultados positivos para comparar la sensibilidad con el estándar de oro. Para la especificidad estimada de las pruebas Dipstick, Doublecheck y Colloidal Gold (99.9%) se observaron intervalos de confianza estrechos, que permitieron establecer que la cantidad de resultados negativos fueron suficientes para evaluar ese parámetro.

La prueba de tamizaje ideal ha sido aquella en la que los valores de sensibilidad y especificidad fueron de 100%, es decir, se observó la máxima sensibilidad y nunca fue negativa en los casos de infección. No se ha demostrado que ninguna de las técnicas disponibles cumpla esta condición y las causas han sido tanto biológicas como técnicas (Anexo 1). Si el objetivo del tamizaje fue la seguridad en el control de productos biológicos como donaciones de sangre, semen, órganos, tejidos, y otros, el criterio de la máxima sensibilidad debió ser prioritario la opción es el tipo de técnica cuyo valor se aproxime más al 100%. Si el objetivo fue el diagnóstico de la infección, el criterio de la máxima especificidad debió ser prioritario (58).

En relación a la exactitud de las pruebas evaluadas, los valores predictivos estimados (VPP y VPN) fueron diversos, los VPP de Doublecheck y Dipstick fueron 99.9% con intervalos de confianza amplios, éstos demostraron la influencia de la baja prevalencia de la infección en la población sobre el VPP. Los intervalos de confianza amplios para esta población sugirieron la necesidad de evaluar las pruebas con mayor cantidad de muestras, ya que se encontraron pocos resultados positivos para comparar la sensibilidad con el estándar de oro. El VPN para Dipstick,

Doublecheck y Colloidal fue 99.9% con intervalos de confianza estrechos. A medida que la prevalencia de infección VIH fue baja en la población, el VPP tiende a ser bajo y por el contrario el VPN tiende a ser alto (57).

A diferencia de los resultados con otras pruebas, al realizarse la evaluación de la prueba Retrocheck en la población con baja prevalencia, se observó sensibilidad de 75.0% (IC_{95%}=21.9-98.7), especificidad de 99.5% (IC_{95%}=98.8-99.8) VPP 33.0% (IC_{95%}=9.0-69.1) y VPN 99.5% (IC_{95%}=99.4-100), basado en estos resultados, el uso de la prueba no es recomendable en esta población ya que proporcionó resultados poco confiables aún cuando los intervalos de confianza fueron estrechos para algunos parámetros de exactitud.

En la evaluación de exactitud para la población con alta prevalencia de VIH, las pruebas Dipstick y Colloidal Gold demostraron sensibilidad de 98.4% con intervalos de confianza estrechos, para Doublecheck 98.8% (IC_{95%}=92.7-99.9). Para la prueba Retrocheck la sensibilidad fue 97.4% (IC_{95%}=90.2-99.6). Todas las pruebas demostraron la sensibilidad esperada en la población estudiada, según otros estudios, si el objetivo del tamizaje fue la seguridad en el control de productos biológicos la máxima sensibilidad debe ser prioritaria y debe optarse por el tipo de técnica cuyo valor se aproxime más al 100.0% (58). La especificidad para las prueba Dipstick y Retrocheck fue 99.8% con intervalos de confianza estrechos, mientras que para Doublecheck y Colloidal Gold la especificidad fue 99.9% también con intervalos de confianza estrechos. Cuando el objetivo ha sido el diagnóstico de la infección, el criterio de la máxima especificidad debió ser el prioritario para haber escogido la prueba a utilizar (58). Las pruebas evaluadas demostraron ser altamente específicas para el diagnóstico de la infección en la población estudiada.

Los VPP en la población con alta prevalencia de VIH fueron para Dipstick 98.4% (IC_{95%}=90.3-99.9), Doublecheck 98.8% (IC_{95%}=92.7-99.9), Colloidal Gold 99.9% (IC_{95%}=92.7-100) y Retrocheck 98.7% (IC_{95%}=92.0-99.9). Los VPN fueron para Dipstick y Colloidal Gold 99.8% (IC_{95%}=98.7-100), Doublecheck 99.9% (IC_{95%}=99.1-100), y Retrocheck 98.7% (IC_{95%}=90.8-99.9). A medida que la prevalencia de infección VIH fue alta en la población dada, el VPP tuvo tendencia a ser elevado y por el contrario el VPN disminuyó (57). Según los valores predictivos encontrados, la aplicación de las pruebas evaluadas proporcionó resultados confiables en poblaciones de alta prevalencia de infección por VIH. Los resultados de los criterios de exactitud incluidos en el estudio demostraron que las pruebas evaluadas son aptas para la población de alta prevalencia.

Según la Tabla 3, el cálculo de la fiabilidad en la población de baja prevalencia mediante la concordancia (índice Kappa) comparada con los resultados del estándar de oro relativo para Dipstick y Doublecheck fue 1.00 y para Colloidal Gold y Retrocheck 0.99. Para las pruebas en estudio de la

población de baja prevalencia el índice Kappa se interpreta como excelente para su uso en la población estudiada (57). La fiabilidad para todas las pruebas evaluadas en la población de alta prevalencia expresada por el índice Kappa fue 0.99 que se califica como excelente para este tipo de población y permite inferir que el uso de las pruebas es fiable en la población de alta prevalencia de VIH.

En cuanto a los resultados falsos (Tabla 2), la prueba Retrocheck dio lugar a falsos positivos, lo cual no la calificó como ideal para su uso, pues se observaron 6 (0.51%) resultados falsos positivos y 1 (0.09%) falso negativo (58). Estos resultados pudieron ser explicados por distintos casos, ya que en las mujeres embarazadas, se ha comprobado que tanto el estado de gestación como pacientes multíparas puede provocar resultados indeterminados o falsos positivos debido a la producción relativa de autoanticuerpos como los dirigidos a antígenos leucocitarios de clase II de células H9 o por la gran cantidad de anticuerpos circulantes (35). Un resultado positivo en una prueba de tamizaje debería complementarse con otra prueba de tamizaje de diferente principio inmunológico para diagnosticar infección por VIH (5). Esto implicaría utilizar otras pruebas para las mismas determinaciones, atrasos en la entrega del resultado de una prueba rápida y disminución en la utilidad de su aplicación en situaciones que requirieran un resultado inmediato, principalmente antes del parto en una embarazada que no hubiera sido controlada con respecto a la infección por el VIH (32). Se ha demostrado que este tipo de resultados aumenta el costo de la realización de las pruebas, disminuye el retorno de pacientes y crea dificultades en el diagnóstico en lugares en los que no se ha contado con equipos especializados para la confirmación del resultado.

En la población con alta prevalencia de VIH, con la prueba Dipstick se observó 1 (0.1%) falso positivo igual que en las pruebas Doublecheck y Retrocheck (0.08%). Para la prueba Dipstick se observó 1 (0.1%) resultado falso negativo asimismo para Doublecheck y Colloidal 1 (0.08%), mientras que para Retrocheck se observaron 2 (0.17%). Estos resultados pueden ser explicados por la presencia de anticuerpos como los dirigidos al virus de Hepatitis A y B, a antígenos leucocitarios presentes en sujetos politransfundidos, enfermedades del hígado, inactivación del suero por calor, positividad a reaginas plasmáticas, procesos hematológicos malignos, insuficiencia renal crónica, trasplante renal, Síndrome de Steve-Johnson o anticuerpos anti-VIH-1 adquiridos de forma pasiva (35).

Del total de muestras comparadas (Tabla 1), se observaron 66 (0.67%) resultados indeterminados, aunque se distribuyeron en todas las pruebas, la mayor cantidad, 33 (1.69%) fueron con la prueba Retrocheck seguido de 14 (0.94%) con la prueba Dipstick. Éstos resultados observados sugieren que el uso regular de éstas pruebas en el laboratorio implicaría esperar el resultado

consecutivo de dos pruebas rápidas para completar el algoritmo diagnóstico (Anexo 1) y por lo tanto, realizar y tener pruebas alternativas disponibles para confirmar el diagnóstico, a pesar de que con la prueba Dipstick se obtuvo un buen desempeño, éste factor debe tomarse en cuenta en la evaluación del uso regular de esta prueba sobre la población estudiada. Para Colloidal Gold y Retrocheck se observó una prueba con resultado falso negativo, según otras evaluaciones, este tipo de resultados aumenta el riesgo de entregar resultados erróneos ocasionando que el paciente infectado continúe sin la atención oportuna, no pueda impedir el progreso de su enfermedad ni el contagio a otras personas (60).

De acuerdo al diseño de estudio (validación de prueba diagnóstica), la estimación de la exactitud y fiabilidad de las pruebas permitió establecer la confiabilidad de las pruebas para su uso en el tamizaje de la infección por VIH en las poblaciones estudiadas a excepción de la prueba Retrocheck (57). Sin embargo, se observaron algunas limitaciones en el diseño del estudio.

Considerando que el mismo debió ser comparativo, transversal, observacional y prospectivo. Se comparó la capacidad diagnóstica de las pruebas en estudio contra un estándar de oro relativo, que, al ser la prueba que permite acercarse más a la certeza diagnóstica, permitió valorar la utilidad del nuevo método en función de la concordancia de sus resultados y, aunque tenía exactitud y fiabilidad conocida, no ha sido usado como método de referencia para el diagnóstico de la infección por VIH. Respecto a lo transversal, cada prueba se realizó una sola vez en cada paciente, ya que en este caso la comparación debía ser intrasujeto, comparando el resultado de la prueba en cada muestra contra el resultado del estándar de oro en la misma muestra (61).

El estudio se limitó a la observación resultados sin realizar ninguna intervención conservando la característica observacional. Las mediciones se planificaron cuidadosamente, fueron estandarizadas y se hicieron en las condiciones correctas para garantizar su confiabilidad, sin embargo los intervalos de confianza fueron bastante amplios determinados por la variabilidad de la población y demostraron que la posibilidad de que los resultados se apliquen a la población en general no es la que se esperaba con el nivel de confianza con el que se calculó la muestra (62).

En cuando a lo prospectivo, se consideró la validez interna del estudio, la magnitud y precisión de los resultados y su aplicabilidad o validez externa.

La validez interna fue aceptable en los aspectos de comparación ciega e independiente con el estándar de oro, y el del ámbito del estudio, que fue similar al ámbito de aplicación de la prueba diagnóstica. Sin embargo, se observó un sesgo de espectro, pues en el diseño, no se consideró que un método diagnóstico validado en un centro de referencia de una especialidad, como en el caso de la CFLAG

suele sobrestimar su capacidad diagnóstica respecto a su aplicación en un centro de atención primaria o en la población general.

La magnitud y precisión de los resultados se vio afectada por la cantidad de muestras utilizadas para la evaluación de las pruebas en la población con baja prevalencia de VIH, pues los intervalos de confianza, que midieron la precisión de las medidas estadísticas, estimados en dicha población fueron amplios mostrando así la necesidad de evaluarlas con mayor cantidad de muestras.

En cuanto a la validez externa, las poblaciones no fueron diferentes en cuanto a criterios de inclusión, aspecto necesario para la misma. Tanto la validez interna como la magnitud y precisión de los resultados la afectaron de forma en que no se pudieron hacer inferencias confiables del uso de las pruebas de tamizaje para VIH en la población con baja prevalencia. Otros aspectos que afectaron la validez externa fueron el inconstante desempeño de las pruebas y, que este estudio solo evaluó rendimiento diagnóstico, por lo tanto, según los valores de capacidad diagnóstica del estudio, no podía garantizar impacto sobre la salud de los pacientes.

A partir de los aportes de este estudio, y en investigaciones futuras, existe la posibilidad de realizar combinaciones de las pruebas rápidas evaluadas en este estudio entre ellas mismas o en combinación con otras validadas para establecer la confiabilidad del desempeño de las mismas en el laboratorio como parte de un algoritmo diagnóstico (Anexo 2).

Para todas las pruebas evaluadas se observaron resultados falsos positivos y falsos negativos, sin embargo, aún cuando la frecuencia de éstos fue alta, pueden reducirse al mínimo utilizando una combinación de pruebas en paralelo o en serie para definir el resultado positivo(16,57).

Otra de las posibilidades sería incluir en un análisis más profundo de las muestras en las que se observen resultados falsos positivos o negativos, que sean diferentes a los obtenidos con el estándar de oro relativo para determinar la causa de la diferencia de resultados o en muestras de pacientes con pruebas positivas para Hepatitis B y C y muestras de banco de sangre para determinar la influencia de este tipo de infecciones en los resultados con las pruebas.

Ya que la competencia entre pruebas en el mercado mejora los precios, reduce los privilegios de los distribuidores y permite que baje el precio de las pruebas es importante realizar este tipo de estudios de validación con otras pruebas disponibles en el mercado que hayan sido validadas.

Puede considerarse además evaluar pruebas en combinación o individualmente que no sean del principio inmunológico de inmunocromatografía con el objetivo de encontrar herramientas diagnósticas de elevada exactitud y fiabilidad en el diagnóstico de la infección por VIH para la población guatemalteca.

IX. CONCLUSIONES

1. La estimación de la exactitud y fiabilidad en este estudio permitió establecer la confiabilidad de las pruebas HIV 1/2 Dipstick™ (Chembio), Doublecheck HIV 1&2™ (Orgenics) y Colloidal Gold™ (Kehua Bioengineering), para su uso en el tamizaje de la infección por VIH y rechazarlo para la prueba Retrocheck HIV™ (Qualpro Diagnostics) en la población baja prevalencia.
2. La estimación de la exactitud y fiabilidad en este estudio permitió establecer la confiabilidad de todas las pruebas evaluadas para el tamizaje de la infección por VIH en la población de alta prevalencia
3. La prueba rápida Retrocheck HIV™ (Qualpro Diagnostics), no demostró ser una prueba adecuada para tamizaje de VIH en ambas poblaciones, observándose frecuentemente resultados no específicos y en población de baja prevalencia dio lugar reiteradamente a falsos positivos.
4. Según los intervalos de confianza amplios en la sensibilidad y valores predictivos positivos estimados para todas las pruebas evaluadas en la población baja prevalencia se observó la necesidad de evaluar las pruebas con mayor cantidad de muestras para aumentar la exactitud de la evaluación.

X. RECOMENDACIONES

1. Utilizar las pruebas rápidas, HIV 1/2 DipstickTM(Chembio), Doublecheck HIV 1&2TM(Orgenics) y Colloidal GoldTM(Kehua Bioengineering), en lugares en los que se necesita rapidez del resultado, o no se cuenta con equipos complejos de diagnóstico o de almacenamiento de muestras, garantizando así mayor accesibilidad a la prueba y mejor cobertura en los servicios de atención de salud. Considerando que la tendencia actual de administración de antirretrovirales es iniciar la terapia de forma temprana reduciendo así costos de las pruebas, costos operativos y de tratamiento de infecciones oportunistas.
2. Evitar el uso de la prueba rápida Retrocheck HIV (Qualpro Diagnostics) ya que puede dar lugar a falsos positivos y negativos y a resultados indeterminados.
3. Asegurar la realización de controles de calidad (control negativo y positivo), por lo menos cada 50 muestras analizadas o en cada corrida, para descartar resultados falsos positivos o falsos negativos.
4. Utilizar las pruebas evaluadas como herramientas de tamizaje de la infección por VIH debido a que la competencia entre pruebas en el mercado mejora los precios, reduce los privilegios de los distribuidores y permite que baje el precio de las pruebas.
5. Comparar las pruebas rápidas DoubleCheckGoldTM HIV 1&2(Orgenics), Dipstick HIV1/2 STAT-PAKTM(Chembio), Retrocheck-HIVTM(Qualpro Diagnostics), y Colloidal GoldTM(Kehua Bioengineering) con otras pruebas de distinto principio inmunológico para encontrar una combinación que permita elevar la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN en el diagnóstico de la infección por VIH.
6. Evaluar las pruebas rápidas DoubleCheckGoldTM HIV 1&2 (Orgenics), Dipstick HIV1/2 STAT-PAKTM (Chembio), Retrocheck-HIVTM (Qualpro Diagnostics), y Colloidal GoldTM (Kehua Bioengineering) en muestras de pacientes con pruebas positivas para Hepatitis B y C y muestras de banco de sangre para determinar la influencia en los resultados que tienen este tipo de infecciones.

XI. REFERENCIAS

1. ONUSIDA (2008). Informe sobre la epidemia mundial de sida. (Ed). <>.
2. Gallo, RC *et al*, (1984). Frequent detection and isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 224:500-503.
3. UNAIDS. (2003) HIV diagnostic tests: Sources and prices of selected drugs and diagnostics for people living with HIV/AIDS.
4. Branson B.M., (2000). Rapid Tests for HIV antibody. *AIDS Reviews*; 2:76-83.
5. Department of Health and Human Services.(2005). Guidelines for assuring the accuracy and reliability of HIV rapid testing: Applying a Quality System Approach. CDC 2005. Geneva: World Health Organization, Doc. Tec. No. 503.
6. Centers for Disease Control. (1992). Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *Morbidity and Mortality Weekly Report*.
7. Martínez, M. (2000). Optimización del retorno de los usuarios que reciben orientación en el diagnóstico de VIH a través de una prueba rápida. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia).
8. Hernández B, Aguilar S. (2000) Proyecto Para El Fortalecimiento Del Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica del VIH/SIDA En Guatemala. Guatemala.
9. Aguilar S. Fernández V. (2000) Situación de la Epidemia de VIH-SIDA en Guatemala. (Proyecto de Acción SIDA de C.A. "PASCA").
10. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., (2000) Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone.
11. Pachón J, Pujol E, Román A. (2003) La infección por el VIH: Guía práctica. (2ª Ed) Gráficas Montereina S.A.
12. Chinen J, Shearer WT. (2002) Molecular virology and immunology of HIV infection. *Journal Allergy Immunology*; 110:189-98.
13. Wyatt R, Sodroski J.(1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*; 280:1884-9.
14. Brookmeyer R, Gail M.H., (1994) AIDS epidemiology. A quantitative approach. Nueva York: Oxford University Press Inc.

15. Armbruster C, Kriwanek S, Vorbach H.(2000). Gender-specific differences in the natural history, clinical features, and socioeconomic status of HIV-infected patients. *Wien Klin Wochenschr*, 112: 754-60.
16. Programa Nacional de Sida. (2010). Manual de Orientación en VIH/SIDA. Guatemala.
17. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. (2010) Informe de Progreso (UNGASS). Guatemala.
18. De Flint SJ, *et al*, (2000) (Ed.). Principles of Virology. *American Society for Microbiology Press* p634.
19. Miller RJ, Cairns JS, Bridges S, Sarver N. (2000) Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *Journal Virology*; 74:7187-95.
20. Sande M.A, Gilbert D.N, Moellering R.C (2002). The Sanford Guide to HIV/AIDS Therapy.
21. Zhang ZQ, *et al*. (1999). Sexual transmission and propagation of simian and human immunodeficiency viruses in resting and activated CD4+ T cells. *Science*. 286:1353-7.
22. Lazzarin A, *et al*. (1999). Man to woman sexual transmission of the human immunodeficiency virus. Risk factors related to sexual behaviour, man`s infectiousness, and woman`s susceptibility. Italian Study Group on HIV heterosexual transmission. *Archives of Internal Medicine*; 151:2411-6.
23. Kwakwa HA Ghobrial MW. (2003). Female to female transmission of human immunodeficiency virus. *Clinical Infected Disease*. 36:40-41.
24. Cohen P.T., Sande M.A., Volberding P.A., (1999) The AIDS Knowledge base. (3^a Ed.), San Francisco.
25. Quinn TC, *et al*. (2000) Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *New England Journal of Medicine*: 342:921-5.
26. Schoenbaum E.E, *et al*. (1989). Risk factors for human immunodeficiency virus infection in intravenous drug users. *New England Journal of Medicine* ; 321:874.
27. Schreiber GB, *et al*. (1996). The risk of transfusion-transmitted viral infections. *New England Journal of Medicine*; 334:1686-90.

28. Dorenbaum A, for the PACTG 316 Study Team. Report of results PACTG 316: Program and abstracts of the 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 2002 February 24-28; Seattle, Washington.
29. Gerberding J.L., (1994). Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus and cytomegalovirus among health care personnel at risk for blood exposure: Final report from a longitudinal study. *Journal Infected Disease*; 170:1410-7.
30. Bertolli J, *et al.* (1996). Estimating the timing of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus in a breast-feeding population Kinshasa, Zaire. *Journal Infected Disease* ; 174:722–6.
31. Phuapradit W, *et al.* ((1999). Maternal viral load and vertical transmission of HIV-1 in mid-trimester gestation. *AIDS*; 13:1927-32.
32. Tudor-Williams G, Lyall E.G.H., (1999). Mother to infant transmission of HIV. *Current Infectious Disease Reports*; 12:21-6.
33. Osmond DH., (1999). Epidemiology and Transmission. En: Cohen PT, Sande MA, Volberding PA. The AIDS Knowledge base. (3^a Ed.) , San Francisco. Disponible en <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite.jsp>.
34. Koup RA, *et al.* (1994). Temporal association of cellular immune response with the initial viral control in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal Virology*; 68:4650-5.
35. Soriano V González-Lahoz J. (2001). Manual del sida. Barcelona: Permanyer S.A.; p. 146-57.
36. Dewar R, *et al.* (1992). Isolation of HIV-1 from plasma of infected individuals: an analysis of experimental conditions affecting succesful virus propagation. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*; 5:822-8.
37. Soriano V, *et al.* (1994). Diagnóstico serológico de la infección por VIH-1. *Revista Clínica Española*; 194:558-67.
38. Center for Disease Control and Prevention. (2006) Revised Recommendations for HIV Testing of Adults, Adolescents, and Pregnant Women in Health-Care Settings. United States MMWR *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 55: RR-1.

39. World Health Organization. (1990) AIDS: proposed WHO criteria for interpreting results from western blot assays for HIV-1, HIV-2, and HTLV-I/HTLV-II. *Weekly Epidemiology Report*; 37:281-8.
40. Genesca J, Wai-Kuo S, Alter J.B., (1989). What do western blot indeterminate patterns for HIV mean in EIA negative blood donors? *Lancet*; 343:1023-6.
41. Center for Disease Control and Prevention. (1998). Update: HIV counseling and testing using rapid tests. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report* ; 47:211-5
42. Phillips S, *et al.* (2000). Diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection with different subtypes using rapid tests. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*; 7: 698-9.
43. Ramalingam S, *et al.* (2002). Rapid particle agglutination test for human immunodeficiency virus: hospital-based evaluation. *Journal Clinical Microbiology*; 40: 1553-4.
44. Oelemann W.M.R., *et al.* (2002). Diagnostic detection of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in urine: a brazilian study. *Journal Clinical Microbiology*; 40:881-5.
45. Clinical update – The new rapid HIV Test. Issues for HIV prevention Counselors. 1998. Disponible en: [< www.hawaii.edu/hivandaids >](http://www.hawaii.edu/hivandaids).
46. Kelen G.D, Shahan J.B, Quinn T.C., (1999). Emergency department-based HIV screening and counseling: Experience with rapid and standard serologic testing. *Annals of Emergency Medicine*, vol. 33, No2, pp. 147-155.
47. McKenna SL *et al.* (1997). Rapid HIV testing and counseling for voluntary testing centers in Africa. *AIDS*; 11 Suppl 1:S103-10.
48. Bulterys M., (2004). Rapid HIV-1 Testing During Labor a multicenter Study. *Journal of the American Medical Association.*; 292:219-223.
49. Morales FK. (2005). *Validación de la prueba VIRINOSTIKA HIV UNI-FORM II Ag/Ab, para el diagnóstico de la infección por VIH en personas que acuden a la Clínica Familiar “Luis Ángel García”*. Tesis de graduación para optar título de Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.

50. Paz LM. (2004). Comparación de dos pruebas rápidas para la detección de la infección por VIH en pacientes embarazadas que asisten a la consulta externa del Hospital General San Juan de Dios. Tesis de graduación para optar título de Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
51. UNAIDS. (2004). HIV Assays: Operational Characteristics (phase1). Report 14 simple/rapid tests.
52. Orgenics. Instrucciones de uso DoubleCheckGold HIV 1&2. Citado 1 de mayo 2005. www.orgenics.com.
53. USAID. HIV Test Kits Listed in the USAID Source and Origin Waiver: Procurement Information Document. 4ta ed. 2008. Consulta:1 de mayo 2009. www.msh.org.
54. Chembio Diagnostics Systems. HIV 1/2 STAT-PAK™ DIPSTICK Assay Catalog #HIV302. Medford, NY.2006.
55. Qualpro Diagnostics. Retrocheck HIV. India 2004.
56. Bioengineering CO., Ltd. Diagnostic kit for HIV (1+2)Antibody (Colloidal gold).
57. Organización Panamericana de la Salud. (2007). Métodos de investigación epidemiológica en Enfermedades Transmisibles. Venezuela, vol. I.
58. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (2006). Diagnóstico Microbiológico de la Infección por VIH. (8ª Ed.). España.
59. FDA. (2011). Vaccines, Blood & Biologics Approved products. Disponible en: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/InfectiousDisease>.
60. Hoyos, A. *et al.* (2003). Falso negativo en la prueba de Western Blot en un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Infectio* 2003;3:173-6.
61. Freedman, D. (2008). Estadística. Barcelona: Antony Bosch. 4ta ed. Pp 115-128.
62. Bellmunt, S. (2007). Validación de pruebas diagnósticas. *ANGIOLOGÍA* 2007; 59: 433-8.

IX. ANEXOS

ÍNDICE

ANEXO 1

Algoritmos diagnósticos para infección por VIH para CFLAG y ASI 46

ANEXO 2

Representación esquemática de las estrategias de diagnóstico para HIV de UNAIDS Y OMS 49

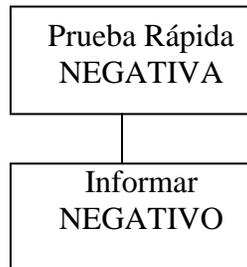
ANEXO 1

Algoritmos diagnósticos para infección por VIH para CFLAG y ASI

El diagnóstico positivo se basa en dos pruebas con diferente principio inmunológico, según las características de las pruebas, del paciente y los recursos pueden ser 2 métodos de tamizaje de diferente principio inmunológico:

- Prueba Rápida + ELISA
- ELISA + Prueba Rápida
- ELISA + ELISA
- Prueba Rápida + Prueba Rápida

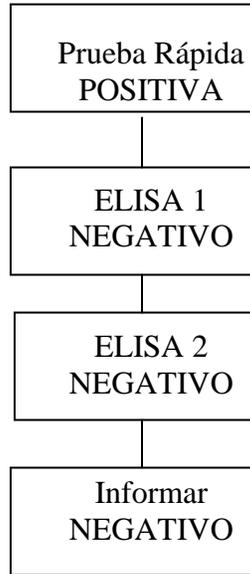
Algoritmo 1



Algoritmo 2



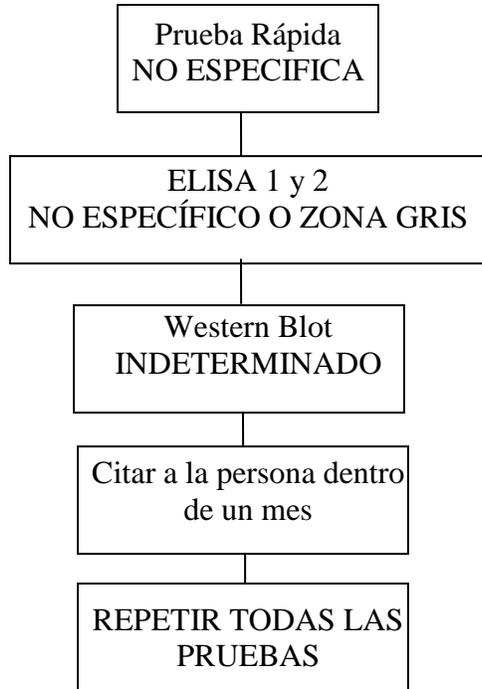
Algoritmo 3



Algoritmo 4

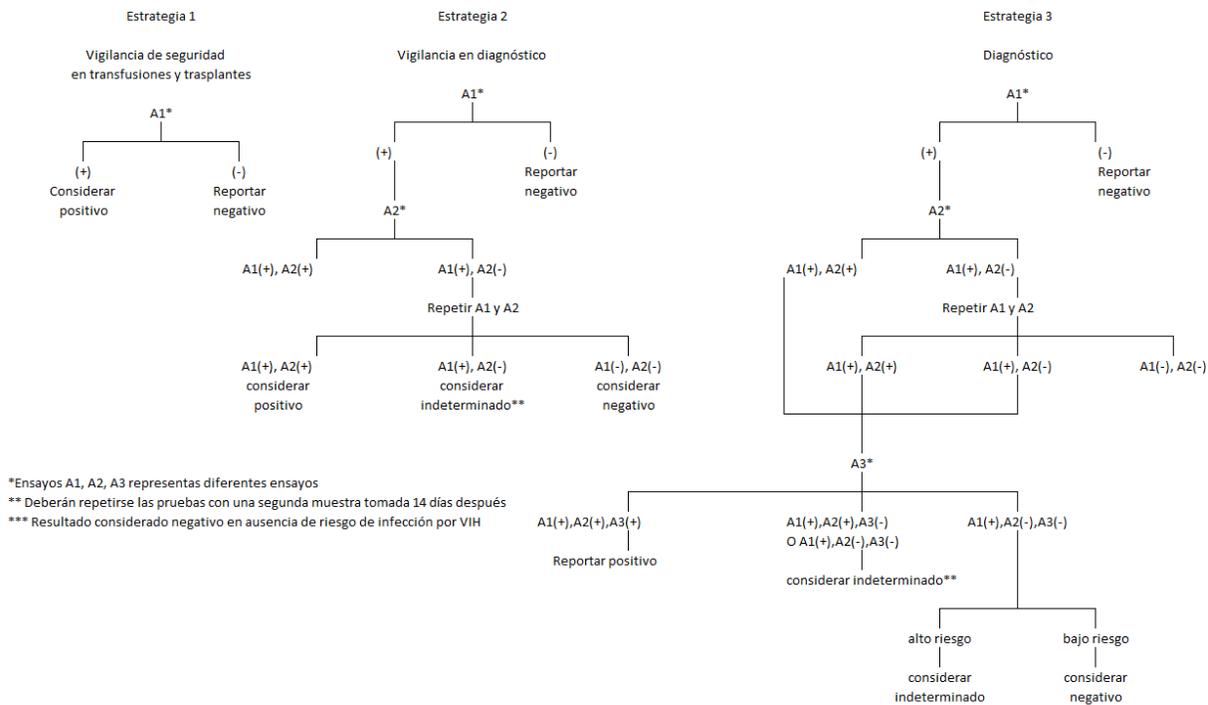


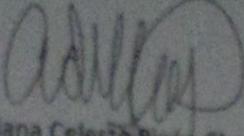
Algoritmo 5



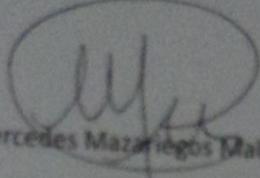
ANEXO 2

Representación esquemática de las estrategias de diagnóstico para HIV de UNAIDS Y OMS

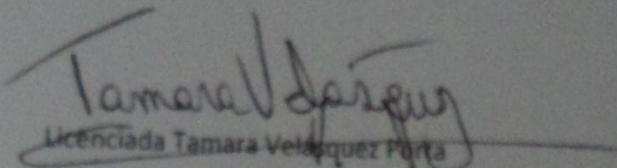



Adriana Celeste Ricón Choc

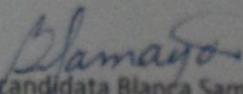
Autora


Maria Mercedes Mazariegos Maldonado

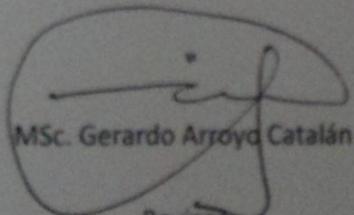
Autora

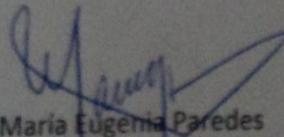

Licenciada Tamara Velásquez Parra

Asesora

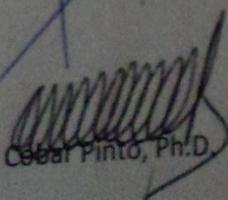

MSPH, DrPH candidata Blanca Samayoa Herrera

Asesora


MSc. Gerardo Arroyo Catalán
Revisor


M.A. María Eugenia Paredes

Directora


Oscar César Pinto, Ph.D.

Decano