

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

**INFORME FINAL DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

**PROYECTO:**

**EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICA Y CONFIRMATORIA  
(WESTERN BLOT) DEL EQUIPO NEW LAV BLOT 1 PARA LA  
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VHI-1 DEL LESP DE CHIAPAS**

**INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**RESIDENTE**

**DAVID RIVERA HERNÁNDEZ**

**NO DE CONTROL 06270236**

**ASESOR EXTERNO:**

**Q.F.B. NORMA LUZ CRUZ SESTEAGA**

**ASESOR INTERNO:**

**Q.B.P. AURA FLORES PÉREZ**

**REVISORES**

**DRA. PATRICIA GUADALUPE SÁNCHEZ ITURBE**

**Q.F.I. DULCE MARÍA HERNÁNDEZ BERISTAÍN**

**TUXTLA GUTIÉRREZ CHIAPAS, JUNIO DE 2011**

**INDICE**

	Página.
Introducción.....	5
Justificación.....	6
Objetivos.....	7
Caracterización del área de trabajo.....	8
Problemas a resolver.....	11
Alcances y limitaciones.....	12
Fundamento teórico.....	13
Procedimiento y descripción de las actividades realizadas.....	35
Resultado.....	48
Conclusiones y recomendaciones.....	52
Referencia bibliográfica.....	55
Anexos.....	57

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Croquis1. Instalaciones del Laboratorio Estatal de Salud Publica.....	9
Figura 2. Croquis 2. Área de trabajo del estudio.....	10
Figura 3. Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana ( <i>Hundt 2006</i> ).....	14
Figura 4. Representación del Genoma del VIH-1 ( <i>Hund (2006)</i> ).....	14
Figura 5. Ciclo replicativo del VIH-1,( <i>Sanches (2009) citado por Turner &amp; Summers (1999)</i> ).....	18
Figura 6. Tropismo de cepas R5 y R4 duales ( <i>Vilades 2009</i> ).....	19
Figura 7. Esquema de Inmunoensayo enzimático , no competitivo, diseñado para la detección de anticuerpos del VIH ( <i>Ochoa 2009</i> ).....	22
Figura 8. Criterios de Interpretación.....	29
Figura 9. Diagrama de Flujo 1. Selección de los pasos de estudio.....	36
Figura 10. Diagrama de Flujo 2. Secuencia de Pruebas y Desarrollo del Estudio.....	37
Figura 11. Continuacion del Diagrama de Flujo 2. Ultimas etapas del Estudio.....	38
Figura 12. Interpretación de los resultados de Prueba Rápida.....	41
Figura 13. Grafico Lineal 1. Comparación del Modelo Teórico del Fabricante y los resultados del Voluntario 01-022-10-CAPA.....	49
Figura 14. Grafico Lineal 2. . Comparación del Modelo Teórico del Fabricante y los resultados del Voluntario 01-032-11-CAPA.....	51

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Tipo de estudio y Criterio de selección.....	39
Tabla 2. Características de los Voluntarios a estudio.....	39
Tabla 3. Ejemplo de cálculo del Valor de Corte. (V.C.).....	43
Tabla 4. Requerimientos De Validación.....	43
Tabla 5. Interpretación de los resultados obtenidos, conforme a los criterios del LESP....	46
Tabla 6. Aspecto de las Proteínas del Genoma del VIH-1 en las tiras de Western Blot.....	47
Tabla 7. Secuencia cronológica de las pruebas Diagnósticas del Voluntario 01-022-10-CAPA.....	48
Tabla 8. Secuencia cronológica de las pruebas Diagnósticas del Voluntario 01-032-11-CAPA.....	50

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde 1997 se viene utilizando la técnica de Western Blot para el diagnóstico de VIH. La realización del presente trabajo titulado evaluación de las pruebas diagnóstica y confirmatoria (western blot) del equipo NEW LAV BLOT 1 para la detección de anticuerpos anti-vhi-1 del LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PUBLICA de Chiapas, se realiza debido a la necesidad de evaluar el desempeño del equipo utilizado para la realización de las pruebas confirmatorias de WESTERN BLOT comprobando su efectividad y veracidad en cuanto a lo que el fabricante afirma en la detección de bandas proteicas en tiempo de progresión de la enfermedad.

El presente trabajo está pensado en evaluar la muestra de sangre de voluntarios que se encuentren en la etapa de ventana inmunológica de la infección con antecedente de pruebas de tamizaje REACTIVA y confirmatoria de WESTERN BLOT indeterminada o negativa los cuales nos puedan proporcionar importante información sociodemográfica, clínica y de conductas de riesgo.

Las muestras de sangre de los voluntarios en periodo de ventana serán analizadas por tamizaje con prueba rápida, prueba de ELISA para comprobar su reactividad y se le realizara una prueba confirmatoria de WESTERN BLOT con el equipo NEW LAV BLOT 1 para la detección de anticuerpos anti-vhi-1

A continuación se le realizara un seguimiento para pruebas diagnósticas complementarias y se analizaran los resultados para conocer la situación del paciente y verificar que los resultados de la prueba confirmatoria de Western Blot concuerden con la etapa y el modelo teórico de la evolución proporcionado por el fabricante.

Se darán un plazo de 3 meses para la realización de la siguiente toma de muestra y análisis tanto de Western Blot como de Prueba rápida y ELISA.

Durante el tiempo de espera, se procederá a realizar un banco de datos de los pacientes y sus diagnósticos para el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP)

Se analizaran los resultados y se compararan los cambios en las proteínas encontradas en Western Blot como en los análisis de ELISA para conocer en qué etapa de la enfermedad se encuentra y si esta corresponde con las proteínas encontradas en las prueba confirmatoria y a la etapa de la enfermedad descrito por el fabricante.

El presente trabajo tiene ciertas limitantes, pues bien, aunque se cuenta con todo el equipo para la realización de los análisis, el conseguir voluntarios en periodo de ventana inmunológica a los cuales se les realice un seguimiento es muy difícil, esto debido a que los pacientes con VIH deben de ser atendidos con total confidencialidad y respeto, lo cual impide una mejor investigación.

## 2. JUSTIFICACIÓN

En México se han diagnosticado con VIH/SIDA a más de 220 000 personas de las cuales hasta marzo del 2011 solo 1 770 están inscritas en el Instituto Mexicano del seguro social.

El reporte médico de los casos de sida e infectados por VIH es obligatorio en nuestro país. Por lo tanto, todas las unidades médicas del país, públicas y privadas, deben reportar oportunamente a la autoridad de salud (jurisdicción sanitaria) cualquier caso nuevo o detección de persona infectada.

Esta información es concentrada a nivel estatal y enviada a nivel central a la Dirección General de Epidemiología (DGE) de la Secretaría de Salud (Ssa), quien tiene bajo su responsabilidad el Registro Nacional de Casos de Sida.

En el estado de CHIAPAS más de cinco mil personas fueron contagiadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en la entidad, en los últimos 24 años.

Las unidades médicas del estado de Chiapas están en coordinación con el CAPASITS quien a su vez tiene bajo su responsabilidad el Registro Estatal de Casos de Sida.

En México se han realizado investigaciones sobre el progreso y el desarrollo de la enfermedad en pacientes con VIH, y reevaluaciones de los criterios de interpretación en pacientes Mexicanos con diversos estadios de la infección.

El proyecto se lleva a cabo porque en el estado de Chiapas es el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) quien se encarga de los diagnósticos e investigaciones en materia de VIH; sin embargo debido a la gran demanda de diagnósticos y atención médica especializada no se ha realizado una evaluación del procedimiento de WESTERN BLOT de la línea BIORAD NEW LAV BLOT 1 equipo para la detección de los anticuerpos ANTI-HIV 1 por inmunotransferencia, comprobando su efectividad y veracidad en cuanto a lo que el fabricante afirma en la detección de bandas proteicas en tiempo de progresión de la enfermedad con el fin de evaluar si se cumplen con las condiciones de calidad estipuladas por el fabricante.

Al termino de este proyecto se pretende conocer la precisión del NEW LAV BLOT 1 en la detección de anticuerpos ANTI-HIV1, comparando con la técnica inmunoenzimática de ELISA, si efectivamente los diagnósticos son precisos en la etapa de la enfermedad que marca el fabricante en su el modelo teórico de la evolución proporcionado por el mismo.

### 3. OBJETIVO

#### **Objetivo general**

Evaluar las pruebas diagnósticas confirmatorias con WESTERN BLOT la efectividad y precisión del el equipo NEW LAV BLOT 1 en los resultados para la detección de VIH.

Confirmar las pruebas diagnosticadas con VIH, utilizando el equipo NEW LAV BLOT 1

#### **Objetivo particulares**

Evaluar el tiempo en el que la prueba WESTERN BLOT con el equipo NEW LAV BLOT 1 da el resultado positivo pasando el periodo de ventana inmunológica.

Conocer la efectividad al distinguir y comparar las proteínas que aparecen en las primeras etapas de la infección con las del modelo teórico entregado por el fabricante

Analizar la precisión de los criterios mínimos de positividad utilizados en el Laboratorio Estatal de Salud Pública y distinguir su importancia en los seguimientos a los análisis de los voluntarios

#### 4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO

El Laboratorio Estatal De Salud Pública (LESP), forma parte de la Secretaria de Salud Pública, se localiza en el Boulevard Salomón González Blanco Núm. 3452 en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez Chiapas.

Las instalaciones fueron inauguradas en 1997, El Laboratorio Estatal De Salud Publica (LESP), tiene como objetivo actuar como unidad de referencia diagnostica en apoyo a los programas de salud pública y enfermedades de importancia epidemiológica y de proyectos de protección contra riesgos sanitarios en el estado de Chiapas.

Está organizado por una dirección a cargo de la Q.F.B. Adriana Gómez Bustamante, Jefe área administrativa que dirige, área de recursos financieros y área de gestión de la calidad, Jefe de área de análisis diagnóstico, que dirige, las áreas redes de laboratorio y las diferentes áreas analíticas de laboratorio.

Los procesos que se desarrollan en El Laboratorio Estatal De Salud Pública son las de dar referencia diagnostica en múltiples estudios microbiológicos, químicos y serológicos en aguas, alimentos y en muestras sanguíneas.

El área donde se realizó el proyecto se llama Serología Epidemiológica, en dicha área se realizan pruebas diagnósticas para la detección de enfermedades como:

- DENGUE NS1, IgM, IgG
- CHAGAS
- SIFILIS
- VIH
- HEPATITIS A,B y C.
- VARICELA
- RUBEOLA
- SARAMPIÓN

En dicha área que se encuentra a cargo de la Q.F.B. Norma Luz Cruz Sesteaga quien a su vez es asesor externo del residente; a continuación se presenta un mapa del Laboratorio Estatal De Salud Pública



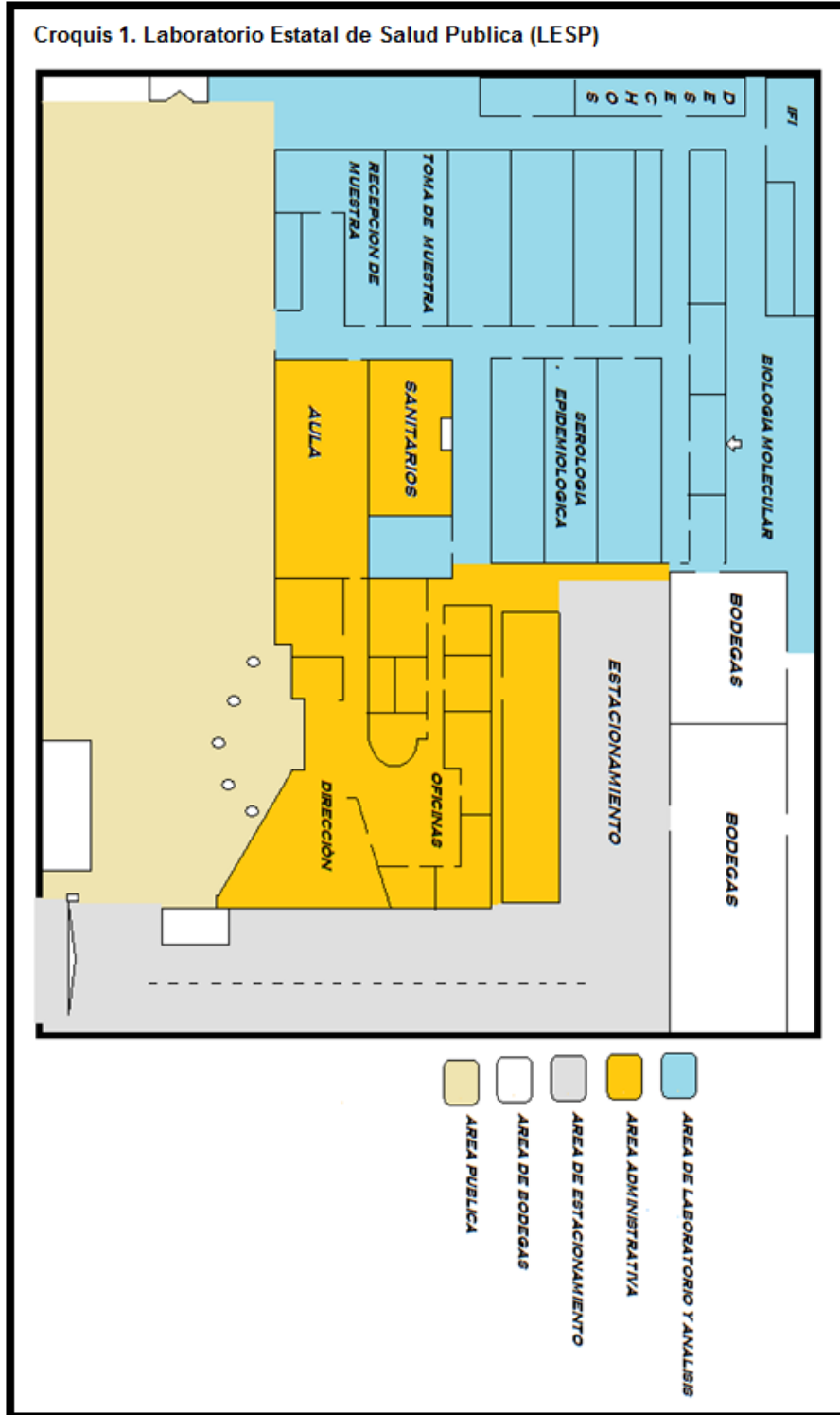


Figura 1. Croquis1. Instalaciones del Laboratorio Estatal de Salud Publica

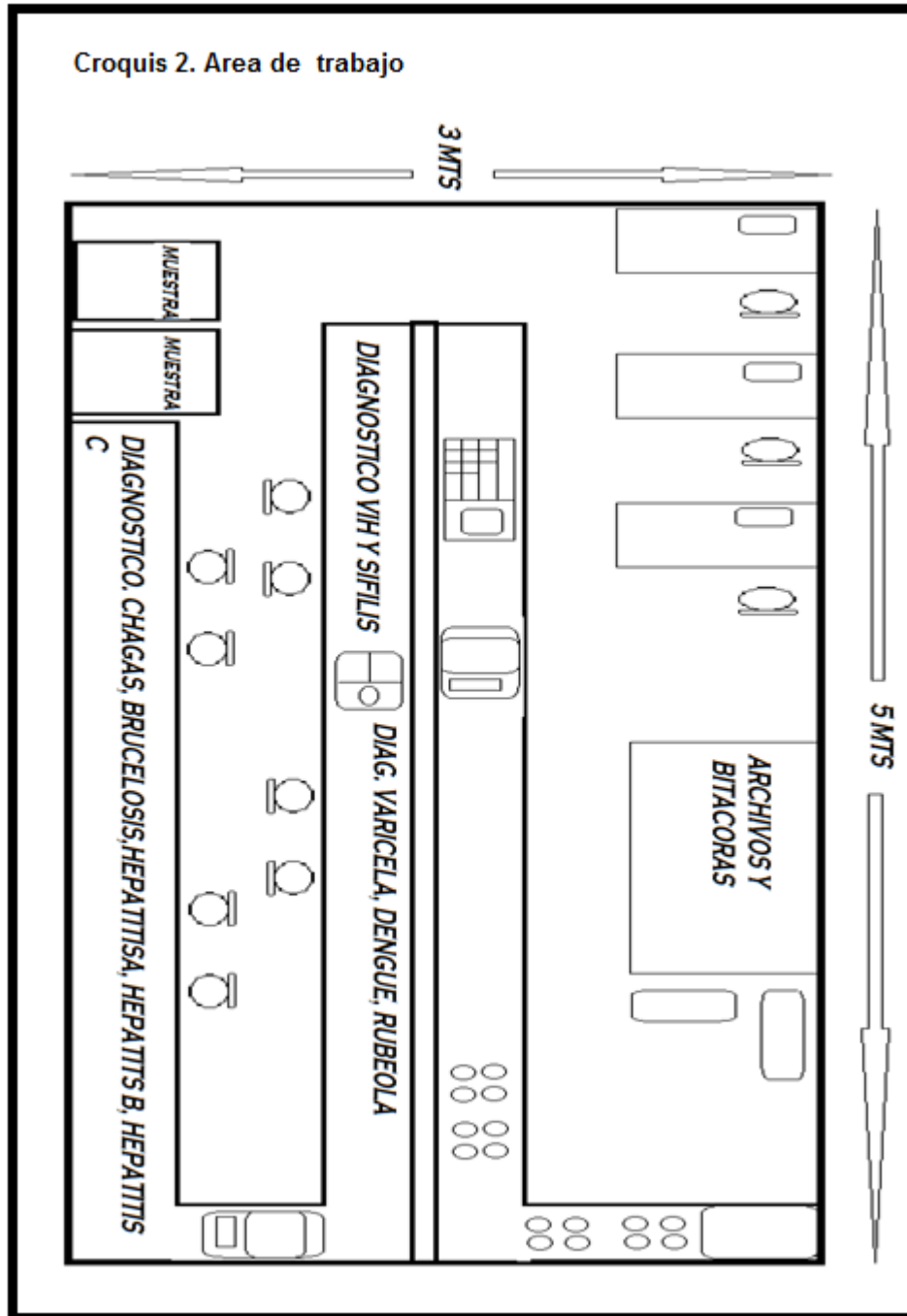


Figura 2. Croquis 2. Área de trabajo del estudio

## 5. PROBLEMAS A RESOLVER

El principal problema que se desea verificar la calidad en cuanto a efectividad y precisión en los resultados para la detección de VIH con el equipo NEW LAV BLOT 1 en las pruebas confirmatorias de WESTER BLOT, esto debido a que nunca se ha realizado una evaluación en cuanto a precisión en el equipo usado para diagnóstico confirmatorio de VIH en el área de Serología Epidemiológica del Laboratorio Estatal De Salud Pública. La realización de un seguimiento y una comparación con el modelo teórico entregado por el fabricante daría certeza y confianza en que se realizan pruebas con excelencia diagnóstica usando siempre equipos de gran calidad.

Con la evaluación del equipo NEW LAV BLOT 1 para WESTERN BLOT con muestras de voluntarios en la etapa de ventana inmunológica se podrá solucionar también algunos problemas adicionales derivados del hecho de no hacer pruebas del equipo que se utiliza con anterioridad los cuales son:

Distinguir las proteínas que aparecen en las tiras de diagnóstico en las primeras etapas de la infección

Analizar y comprender porque un resultado de Prueba rápida o de ELISA puede dar reactivo y un diagnóstico de Western Blot puede dar Negativo.

Además se buscara solucionar un problema con respecto al control de información de los diagnósticos de VIH

- La creación de una base de datos sobre las pruebas diagnósticos de VIH en el Laboratorio Estatal de Salud Pública que pueda proporcionar un reporte estadístico del progreso de la pandemia de VIH en el estado de Chiapas con el fin de poder acceder a información estadística de una forma efectiva y real.

## 6. ALCANCES Y LIMITACIONES

Este trabajo de investigación incluye a las personas infectadas por el VIH en el estado de CHIAPAS, tengan o no diagnóstico de sida (Indeterminado) y proporciona importante información sociodemográfica, clínica y de conductas de riesgo.

Esta es un trabajo sin precedente en el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP), ya que no se había realizado una investigación sobre la relación CD4-CARGAVIRAL y su seguimiento para conocer el comportamiento de la cepa de VIH en el estado de Chiapas correlacionándola con pruebas de WESTERN BLOT.

La investigación abarca a candidatos voluntarios los cuales mantendrán su confidencialidad con historial diagnóstico REACTIVO en prueba de tamizaje.

Para la investigación se seleccionaron detalladamente candidatos que debían de cubrir ciertos requisitos entre los cuales están.

- Haber realizado una cita y un primer análisis en el CAPACIT Tuxtla.
- Haber resultado con prueba rápida REACTIVA
- Contar con historial clínico
- Acudir a toma de muestra en el Laboratorio Estatal de Salud
- Haber resultado con segunda prueba rápida REACTIVA en el LESP
- Haber resultado con primer prueba de WESTERN BLOT indeterminada
- Acceder a realización de la investigación manteniendo en todo momento su confidencialidad
- En la realización de la investigación haber resultado con prueba de tamizaje REACTIVA realizada por el residente
- Haber resultado con segunda prueba de WESTERN BLOT POSITIVO realizado por el residente.
- Acudir a realización de CARGA VIRAL y CD4 en el área de biología molecular

Las limitaciones son debidas a:

- La participación voluntaria de los pacientes, ya que para esta investigación ha sido necesario la aceptación del paciente, y la realización de una serie de tomas de muestras.
- La participación y cooperación de las áreas de CAPACIT, serología epidemiológica, biología molecular. Las cuales han proporcionado su cordial apoyo a la realización de las pruebas y al diagnóstico para la elaboración de esta investigación.
- El tiempo de seguimiento de los pacientes, y las conductas de riesgo que presentan, para proporcionar una información verídica.
- La gran demanda de estudios diagnósticos que solicita la población el cual por ser prioridad y por el tiempo no permiten hacer investigaciones más detalladas.
- La confidencialidad de los pacientes la cual siempre debe ser protegida, exigen que no se divulgue cierta información.

## 7. FUNDAMENTO TEORICO

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el causante de la pandemia mundial del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y forma parte de la familia Retroviridae la cual engloba un número importante de virus. Todos ellos son similares en cuanto a organización genómica, estructura y ciclo replicativo. De los distintos géneros de retrovirus hay dos que engloban especies que infectan a seres humanos: los lentivirus y los deltarretrovirus. Dentro del género de los lentivirus se encuentran los virus de la inmunodeficiencia humana<sup>1</sup>. Actualmente se conocen dos retrovirus capaces de producir inmunodeficiencia en seres humanos, VIH-1 y VIH-2. El más extendido y virulento es el VIH-1, cuyos tres grupos filogenéticos derivan de virus muy semejantes encontrados en los chimpancés. Se ha demostrado que este virus procede del virus de chimpancé VIScpz, que ha cruzado la barrera de las especies y ha infectado a la población humana al menos en tres ocasiones distintas y ha dado lugar a tres grupos distintos de VIH-1: el grupo M, que es el mayoritario en la pandemia del SIDA, y otros dos grupos menos extendidos: el O (de outlier o marginal), del que se han descrito varios centenares de casos, y el grupo N, del que sólo hay seis casos censados. El VIH-2 es menos virulento y está extendido principalmente en África occidental. Los monos de cara tiznada o mangabeis están ampliamente infectados por VIS y son el reservorio del VIH-2. Los análisis filogenéticos demuestran 8 grupos de VIH-2 que derivan de otras tantas introducciones en el hombre a partir de mangabeis de cara tiznada. Los primeros casos de SIDA se describieron en Los Ángeles en junio de 1981 y en diciembre del mismo año se caracterizó como entidad nosológica. En 1983 se identificó un nuevo retrovirus del cual se demostró su implicación etiológica en el SIDA y se denominó virus de la inmunodeficiencia humana. Sin embargo, el origen del VIH precede en al menos cinco décadas a su identificación como agente causal de la enfermedad (*Sánchez, 2009*).

### **Estructura de los virus de la inmunodeficiencia humana**

El VIH-1 es una partícula esférica de 80 a 100 nm, con una estructura en tres capas: la interna o nucleoide, que contiene dos hebras completas de ARN más la nucleoproteína y las enzimas víricas, una cápside icosaédrica y una envoltura derivada de la célula huésped, donde se insertan las glicoproteínas (gp) y los antígenos de histocompatibilidad de clases I y II que derivan de la célula huésped

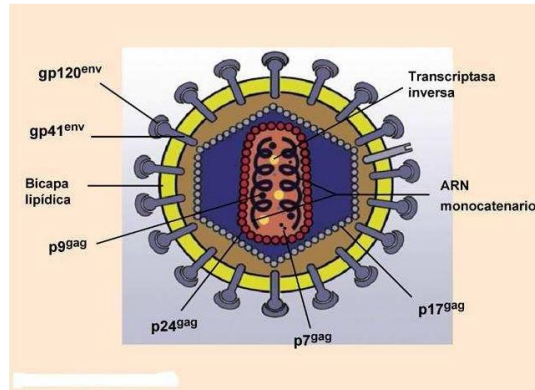


Figura 3. Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana (Hundt, 2006)

El genoma del virus es un ARN de cadena única formada por dos hebras idénticas, de polaridad positiva, de 9,6 kilobases de longitud. Las dos moléculas de ARN están físicamente unidas mediante puentes de hidrógeno en sus extremos. La organización genómica de los retrovirus es siempre la misma: 5'-gag-pol-env-3' y, además, dependiendo del tipo de retrovirus, hay genes adicionales, reguladores y accesorios, que en el caso del VIH-1 son 6: tat, rev, nef, vif, vpr y vpu. En ambos extremos del genoma se encuentra una secuencia repetida (región LTR) de entre 18 y 250 nucleótidos según la especie. A continuación, y siguiendo el sentido 5'-3', hay una región no codificante única, que es la primera en transcribirse y que formará el extremo 3' del provirus. Después viene la región de unión del primer ARNt específico, la región líder, los genes que codifican para las proteínas del virus, la cola de polipurinas y la región U3, que formará el extremo 5' del provirus como se muestra en la figura 4.

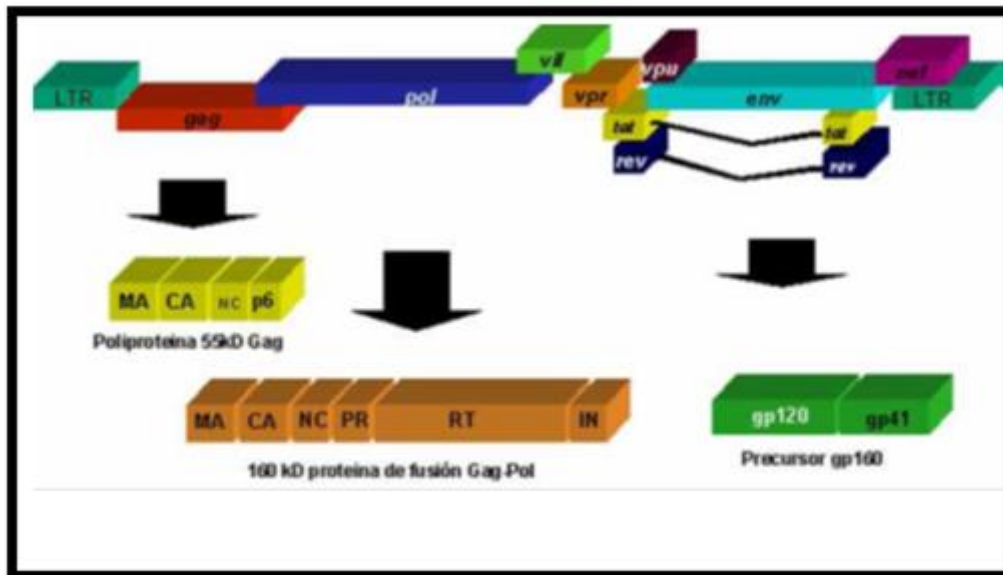


Figura 4. Representación del Genoma del VIH-1 (Hunt 2006)

## **Estructura y expresión del genoma de VIH**

### **Gen gag**

Este gen codifica inicialmente una proteína precursora de 55 kD denominada p55. Durante la traducción, el extremo aminoterminal de esta proteína es miristilado, lo que desencadenará una asociación con la membrana de la célula infectada. Durante el proceso de la maduración vírica, esta proteína temprana p55 es escindida, por una proteasa codificada por el gen pol, en cuatro proteínas más pequeñas: la p17 (de la matriz), la p24 (de la cápside) y las proteínas de la nucleocápside p7 y p6.

El polipéptido p17 de la matriz deriva del extremo N-terminal miristilado de la p55. La mayoría de las moléculas p17 interactúan con la cara interna de la bicapa lipídica del virión y estabilizan la partícula. Sin embargo, un subconjunto de moléculas p17 se introduce en las capas más profundas del virión, donde se convierten en parte del complejo que acompaña el ADN vírico hasta el núcleo. Estas moléculas facilitan el transporte nuclear del genoma vírico, debido a que una señal cariofílica de la p17 es reconocida por la maquinaria celular de importación nuclear. Este fenómeno permite que el VIH infecte las células que no están en división, una característica inusual para un retrovirus.

La proteína p24 de la cápside forma el núcleo cónico de las partículas víricas. Se sabe que la ciclofilina A, una chaperona que facilita la estructuración de proteínas, interactúa con la p24, produciéndose la incorporación de la ciclofilina A en la partícula vírica. La posterior interacción entre el gag y la ciclofilina A parece esencial en el desensamblaje de la cápside, ya que la ausencia de esta interacción inhibe la replicación vírica.

### **Gen pol: precursor gag-pol**

La proteasa, la transcriptasa inversa, la RNasa H y la integrasa son proteínas víricas que se expresan a través de una proteína de fusión Gag-Pol denominada p160. Este precursor Gag-Pol se genera por un cambio de lectura ribosomal, provocado por un motivo específico del ARN (una secuencia heptanucleotídica seguida de una pequeña estructura en horquilla en la región distal del ARN gag). Cuando los ribosomas encuentran este motivo, cambian, en aproximadamente un 5% de las veces, al marco de lectura de pol sin interrupción de la traducción. La frecuencia de cambio de lectura ribosomal explica por qué las secuencias gag y gag-pol se expresan en un cociente de aproximadamente 20:1.

Durante la maduración, una proteasa vírica escinde el polipéptido Pol de Gag y posteriormente lo digiere, separándose la proteasa (p10), la transcriptasa inversa (p50), la RNasa H (p15) y la integrasa (p31). Todas estas escisiones no siempre ocurren de manera eficiente; por ejemplo, aproximadamente el 50% de las transcriptasas inversas (p50) permanecen ligadas a la RNasa H (p15) como un solo polipéptido (p65).

Proteasa (p10): es una aspartilproteasa que actúa como un dímero. Su actividad se requiere para la escisión de los precursores poliproteicos gag y gag-pol durante la maduración vírica, tal como se ha comentado previamente. La estructura tridimensional del dímero de la proteasa se ha caracterizado, lo cual ha permitido desarrollar nuevos

fármacos dirigidos precisamente a inhibir su función. Estos compuestos antivíricos han supuesto un gran avance en la mejora del tratamiento de las personas infectadas.

Transcriptasa inversa (p50) y RNasa H (p15): la forma funcional predominante de la polimerasa vírica es un heterodímero de p65 y p50. Durante el proceso de la transcripción inversa característico de los retrovirus, la polimerasa hace una copia de ADN a partir del dímero de ARN monocatenario presente en el virión. A continuación, la ribonucleasa H elimina el molde original de ARN del primer filamento de ADN, con lo que se permite la síntesis del filamento complementario de ADN. El ADN bicatenario vírico puede ser completamente sintetizado en un plazo de seis horas después de la entrada vírica, aunque puede permanecer sin integrarse durante períodos prolongados. Se necesitan muchos elementos activos en el ARN vírico para la formación del ADN. Por ejemplo, se ha observado que el denominado elemento TAR, una pequeña estructura en horquilla situada en el extremo 5' del ARN vírico y que contiene un sitio de unión para la proteína activadora de la transcripción Tat, es necesario para la iniciación de la transcripción inversa. Por otro lado, debido a que la polimerasa vírica no contiene actividad correctora, el proceso de replicación es propenso a sufrir errores, y en cada nueva copia del genoma vírico se introducen varias mutaciones puntuales. Este hecho explica la extremada variabilidad genética del VIH y la existencia de una población vírica heterogénea (cuasiespecies) dentro de un mismo individuo.

Integrasa (p31): una vez sintetizado el ADN provírico, se acopla a una serie de factores celulares y víricos, formando el complejo de preintegración, que es transportado al núcleo, donde tiene lugar la inserción del ADN vírico en el ADN cromosómico de la célula infectada. Este proceso de integración realizado por la integrasa se lleva a cabo en tres fases. Primero, una actividad exonucleasa corta dos nucleótidos de cada extremo 3' del ADN vírico. A continuación, una actividad endonucleasa escinde el ADN celular en el sitio de integración. Finalmente, una actividad ligasa genera un enlace covalente en cada extremo del ADN provírico. Se cree que es entonces cuando las enzimas celulares reparan el sitio de la integración. No se requiere ninguna fuente de energía exógena, como ATP, para estas reacciones. La accesibilidad del ADN cromosómico parece ser un factor que influye más en la elección de los sitios de integración que la existencia de determinadas secuencias específicas en el ADN. Así, los sitios de ADN cromosómico no condensados son considerados "puntos calientes" para la integración. Esta integración preferencial en las regiones de cromatina abierta, transcripcionalmente activas, parece facilitar la expresión del provirus. Por otro lado, si el ADN provírico no está integrado, los genes víricos no se expresan eficientemente

### Gen env

La proteína precursora de envoltura, Env, de 160 kD (gp160) se expresa a partir del ARNm maduro o tardío (al igual que gag y pol). Inicialmente es sintetizada en el retículo endoplásmico y, posteriormente, migra al aparato de Golgi, donde es glucosilada mediante la adición de 25 a 30 cadenas laterales de carbohidratos que son agregados a residuos de asparagina en el extremo N-terminal. Esta glucosilación es imprescindible para la infectividad vírica. Posteriormente, una proteasa celular escinde la gp160 en dos subunidades, la proteína superficial (gp120) y la proteína transmembrana (gp41), que permanecen asociadas entre sí de manera no covalente y que oligomerizan, generalmente en trímeros, en la superficie del virión. En la partícula vírica madura, estos trímeros dan



lugar a las 72 proyecciones externas visibles en la bicapa lipídica de la superficie vírica. (Alzira, 2005)

### Ciclo biológico del VIH

El ciclo de replicación del VIH se divide en dos etapas bien diferenciadas. Tras una primera etapa de adsorción, fusión e internalización del virión que ocurre en la membrana celular, el virus se retrotranscribe de ARN viral a ADN proviral en el citoplasma mediante la acción de la transcriptasa inversa. Posteriormente, el complejo de replicación es transportado al núcleo donde el ADN proviral se integra en el ADN celular. El ciclo prosigue con la transcripción y activa traducción de las proteínas virales y termina con la morfogénesis y salida de nuevos viriones como se observa en la figura 5.

### Ciclo de replicación del virus

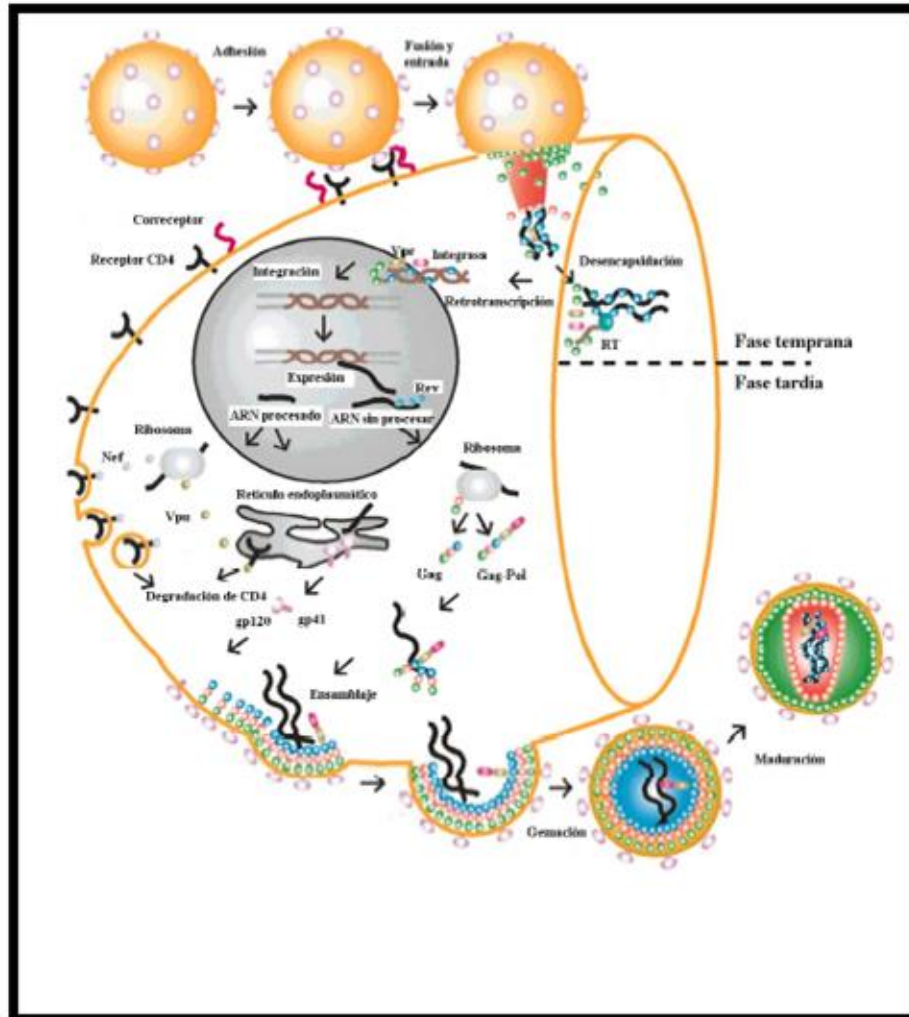


Figura 5. ciclo replicativo del VIH-1, (Sanches (2009) citado de Turner & summers, 1999)

### Adsorción, fusión e internalización del virión

Para iniciar la infección, las proteínas de la envoltura del VIH facilitan la fusión de las membranas viral y celular, y permiten la invasión del genoma viral en la célula. El gen env codifica para una proteína que se glucosila denominada gp160, cuya escisión mediante una proteasa celular da lugar a una glucoproteína superficial gp120 y otra transmembrana, gp41, y ambas permanecen asociadas de forma no covalente. La interacción de gp120 con el receptor CD4 en la membrana celular induce un cambio conformacional en la gp120, resultando en la exposición de epítopos conservados que se encontraban ocultos, los cuales posibilitan la unión de este complejo a un segundo receptor (coreceptor) que pertenece a la familia de los receptores de quimioquinas y está firmemente anclado en la membrana celular. Se conocen varios coreceptores que facilitan la entrada del VIH-1 al interior de la célula, pero los que utiliza principalmente son el CCR5 y CXCR4. La unión del virus al coreceptor provoca otro cambio conformacional, esta vez en la proteína transmembrana (gp41) que posibilita la fusión de la envuelta viral con la membrana celular, y posterior entrada de la nucleocápside viral. El uso de un coreceptor u otro, por parte del virus, define el tropismo de la cepa viral hacia macrófagos (cepas R5) o linfocitos (cepas X4) o hacia linfocitos o macrófagos indistintamente (cepas R5X4 o duales) como se observa en la figura 3. Las cepas R5 son las que existen en las fases iniciales de la infección, lo que indica el papel crítico de esta variante en la transmisión y en las etapas tempranas de la infección. Esta variante es la que también se detectará durante la fase asintomática de la enfermedad, pero a medida que avanza la infección se observa la presencia de cepas con tropismo X4 o dual (R5X4), cepas inductoras de sincitios, que están asociadas con la progresión de la enfermedad y depleción de linfocitos CD4+

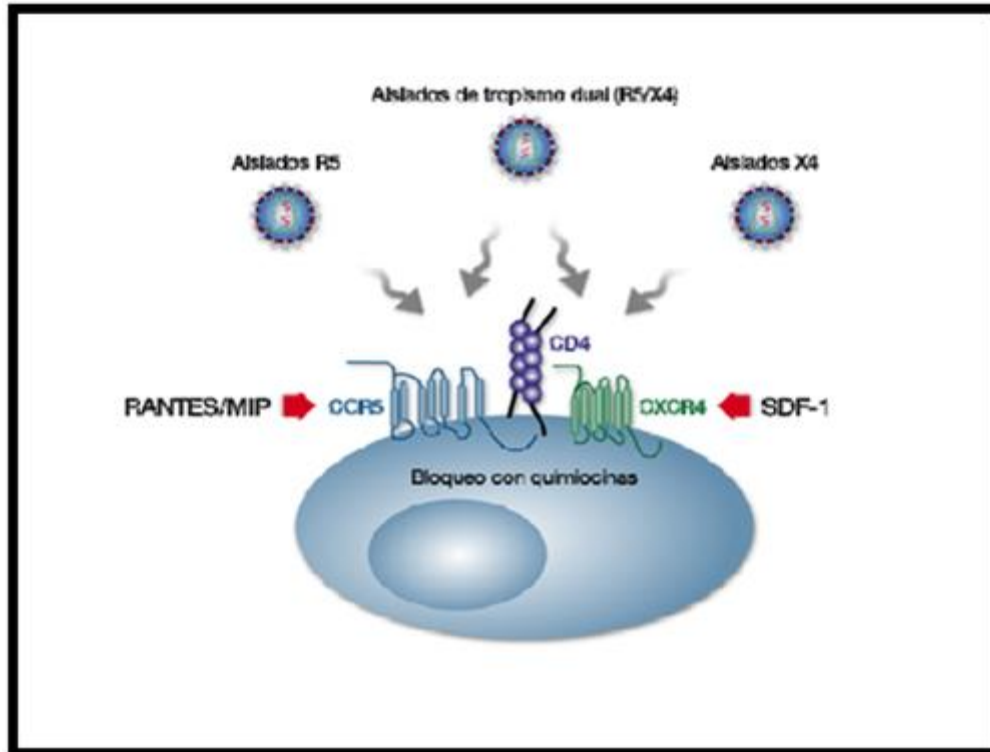


Figura 6. tropismo de cepa R5 y R4 duales (Vilades 2009)

#### Transcripción inversa e integración:

Tras la entrada del virus se inicia su replicación mediada por la transcriptasa inversa (TI) contenida en el virión, que cataliza la formación de la primera cadena de ADN a partir del ARN viral. Para la síntesis de las dos cadenas de ADN viral se requiere la acción del dominio de ribonucleasa H, que degrada parcialmente el molde ARN original. Posteriormente el ADN de doble cadena lineal se integra en los cromosomas celulares, proceso catalizado por la integrasa viral. Para la integración del ADN viral en los cromosomas celulares, es necesario que el complejo de preintegración vaya acompañado de varias proteínas virales más alguna celular y se introduzca en el núcleo. El VIH se integra normalmente en células activadas, en las que no existe membrana nuclear.

(Viladés et al, 2009).

#### Latencia:

Se produce tras la infección y la integración del provirus. Sólo el 1% de los linfocitos CD4 están infectados y expresan ARN viral, para lo cual se requiere activación celular mediante estímulos formados por antígenos, citoquinas y mitógenos. En los últimos años una serie de trabajos apuntan a que la latencia podría ser un fenómeno "activo" en el sentido de que sería mantenida por una serie de factores celulares como Murr-1. Recientemente se ha comunicado que la proteína APOBEC3G, un factor de restricción celular que impide la

replicación viral estaría también implicada en el mantenimiento de la latencia del VIH. La neutralización de APOBEC aumenta la permisividad celular a la replicación ya que incluso linfocitos no activados replican el VIH de forma masiva. (*Viladés et al, 2009*).

### Transcripción:

El siguiente paso en el ciclo biológico del VIH es la expresión de genes virales y síntesis del ARN que formará el genoma del nuevo virus. Las secuencias LTR contienen los elementos promotores para el inicio de la transcripción. El provirus latente inicia su transcripción mediante factores de transcripción del hospedador, como NF- $\kappa$ B, Sp1 y el factor de transcripción TFIID (Transcription Factor IID). El factor NF- $\kappa$ B no existe en forma activa en los linfocitos CD4+ en estado de reposo celular y es inducido únicamente en el curso de los procesos de activación inmunológica, por lo que la replicación del VIH depende de la activación de los linfocitos infectados. Las proteínas Tat y Rev del virus son esenciales para la síntesis y procesamiento del ARNm viral. Una vez iniciada la síntesis del ARN viral, la expresión de la proteína viral Tat aumenta la tasa de transcripción del genoma del VIH y en cooperación con otros factores celulares, permite la elongación completa del ARNm del virus. El resultado de la transcripción es un único transcrito de ARN mensajero (ARNm) que debe salir al citoplasma para ser procesado en ARN de diferentes medidas. Ambas etapas, procesamiento y transporte, son realizadas fundamentalmente por otra proteína viral denominada Rev. En condiciones de transcripción activa del virus se calcula que llegan a producirse por día en una persona infectada varios miles de millones de nuevas partículas virales, para lo cual se activan varios millones de linfocitos CD4+. (*Viladés et al, 2009*)

### Morfogénesis y salida:

La traducción del ARNm proporciona la síntesis de poliproteínas que deben ser procesadas para formar las proteínas constitutivas del virus y estas ya podrán ser procesadas por las proteasas virales, a excepción de la gp160 que será procesada en gp120 y gp41 por proteasas celulares. En este proceso también participan otras proteínas virales, entre las que destacan vif y vpu. Vif es necesario para el correcto ensamblaje de las partículas virales y vpu para la gemación de estas partículas. Además, estas proteínas virales son importantes en las fases finales de la infección ya que vpu aumenta la liberación de viriones y vif aumenta la infectividad entre 100 y 1000 veces.

La proteína vif interacciona y neutraliza la acción antiviral del factor celular APOBEC3G, esta proteína actuaría sobre el ARN genómico mensajero del VIH presente en el citoplasma evitando la producción de partículas virales. Las proteínas virales son transportadas a las inmediaciones de la membrana celular, donde ya estarán insertadas las proteínas gp120 y gp41. Es en la membrana celular donde se van a producir las

distintas interacciones, entre precursores del core, core viral, proteínas de la envuelta y membrana celular, que darán lugar a la partícula viral. La generación de la nueva partícula viral acabará con el proceso de gemación en el que se lleva una parte de la membrana de la célula huésped. (*Viladés et al, 2009*).

### **Inmunoensayo Prueba Rápida**

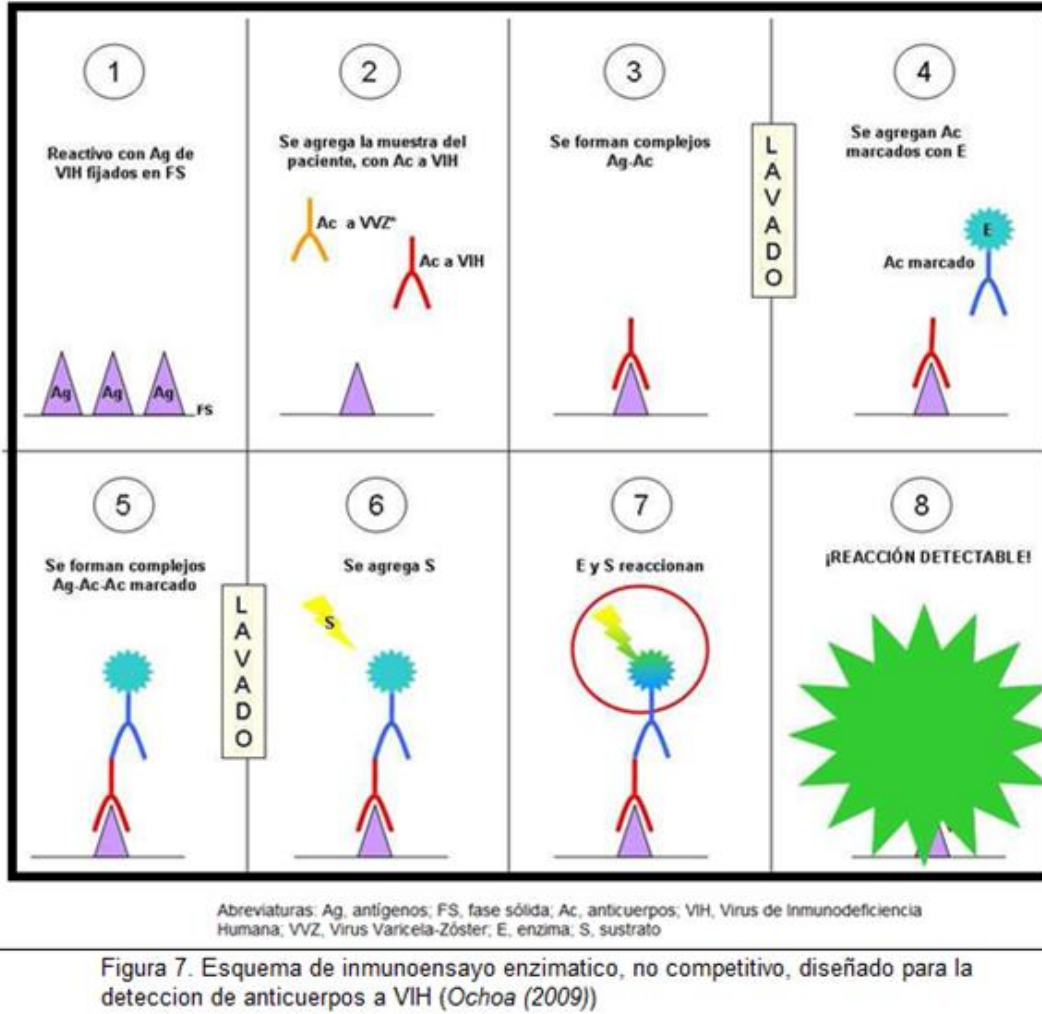
La Prueba Rápida se utiliza en la detección de VIH se basa en la técnica de Inmunoensayo en Sándwich de flujo lateral, la membrana es cubierta con antígenos recombinantes de VIH en la región de la línea de prueba de la placa. Cuando la muestra es aplicada en un extremo de la membrana, reacciona con las partículas recubiertas con la Proteína A que ya ha sido aplicada a la muestra en el mismo extremo. La mezcla migra cromatográficamente hacia el otro extremo de la membrana y reacciona con los antígenos recombinantes de VIH en la membrana de la región de la línea de prueba.

### **VIH-Inmunoensayo Prueba de ELISA**

El ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: Ensayo de Inmoadsorción Ligado a Enzima) es una técnica de ensayo Inmunoenzimática (EIA: Enzyme-ImmunoAssay) que permite la detección tanto de antígenos como de anticuerpos.

El diagnóstico de la infección por VIH, mediante pruebas de laboratorio inicia con la determinación de inmunoglobulinas dirigidas al VIH, presentes en una muestra sanguínea. Estos anticuerpos a VIH se detectan por IE, los cuales emplean complejos anticuerpoantígeno (inmuno-complejos) para medir la presencia de un analito específico en una muestra. Los analitos buscados pueden ser fármacos, antígenos y, en el caso de la infección por VIH, anticuerpos dirigidos contra antígenos virales. Los IE se caracterizan por su amplia disponibilidad y bajo costo. La clasificación de los IE es diversa; por ejemplo, pueden ser realizados en forma manual, semi-automatizada o completamente automatizada. También se categorizan en homogéneos y heterogéneos; a las técnicas de IE que requieren la separación del complejo antígeno-anticuerpo, se les conoce como IE heterogéneos; las que no requieren separación se denominan IE homogéneos. Otra clasificación los divide en formato competitivo y no competitivo; en los IE competitivos, el analito sin marcar (generalmente antígeno) en la muestra se detecta por su capacidad para competir con un antígeno marcado en el IE con un anticuerpo fijado en fase sólida; el analito bloquea la capacidad del antígeno marcado de unirse (por competencia); en los IE no competitivos, el analito (por ejemplo, los anticuerpos a VIH) reacciona con antígenos fijados en una fase sólida y posteriormente, sin separarse, reacciona con anticuerpos marcados; los IE no competitivos proporcionan sensibilidad y especificidad altas; por esto, actualmente su uso está generalizado y también se denominan en “sándwich”, ya que el analito está unido entre dos reactivos específicos. A continuación se describe el método empleado para la detección de la señal.

Enzimoinmunoensayo (EIA o ELISA): Se emplean enzimas como método de detección; las más utilizadas son fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y galactosidasa B. En la última fase de estas técnicas, se agrega un sustrato que reacciona con la enzima del reactivo para producir una señal detectable; se requiere un equipo específico para detectar la señal, la cual puede ser un cambio de color o emisión de luz; la intensidad de la señal indica la concentración de enzimas presentes, e indirectamente del analito detectado. (*Ochoa, 2009*)



La figura 7 esquematiza las reacciones que ocurren en un IE para VIH, con marca enzimática. Los antígenos fijados en fase sólida son proporcionados por el fabricante y al agregar la muestra de un paciente (con anticuerpos a VIH), los antígenos se combinan con los anticuerpos de la muestra; posteriormente, se agrega un anticuerpo marcado con enzimas y dirigido a los anticuerpos humanos (un auto-anticuerpo, proporcionado también por el fabricante), el cual se combina y forma un complejo en “sándwich”; finalmente, la adición de un sustrato permite la formación de color, detectable por el equipo de diagnóstico; Las fases de lavado eliminan las sustancias no combinadas; Debe enfatizarse que, si no existen anticuerpos en el paciente, que reaccionen con los antígenos, los lavados eliminan todos los componentes no fijados y no se produce reacción detectable. (Ochoa, 2009)

### Pruebas para confirmación diagnóstica

La trascendencia de la infección por VIH hace necesaria la confirmación de los resultados positivos del IE a VIH. La técnica más ampliamente utilizada es el WB.

El WB se basa en inmunotransferencia que separa los antígenos del VIH por la diferencia en peso molecular; esto permite la identificación de cada anticuerpo específico. El WB contiene antígenos del VIH, algunas de sus proteínas precursoras y antígenos de origen celular. Existen distintos criterios de positividad propuestos para la interpretación del WB a VIH, Una muestra sanguínea se considera positiva por WB cuando cumple el criterio de positividad adoptado, negativa cuando no se observa ninguna banda de reactividad e indeterminada cuando se observa reactividad distinta a la del criterio de positividad (Ochoa, 2009)

### **Investigaciones Anteriores Sobre el VIH y la Técnica de Western Blot**

Aunque si bien las pruebas confirmatorias de WESTERN BLOT son consideradas una maravilla del diagnóstico, se han hecho estudios en distintos países para conocer su desempeño, se presentan a continuación investigaciones anteriormente realizadas en las cuales se basa el presente trabajo

#### “Evaluación de un Sistema de Western Blot (Davih-Blot) para la Confirmación de Anticuerpos al Vih-1”

Evaluación del sistema DAVIH-BLOT (Laboratorios DAVIH, Cuba) frente a los paneles de proficiencia enviados al Laboratorio Nacional de Referencia del SIDA, por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el aseguramiento de la calidad en el diagnóstico de anticuerpos al VIH en los años 1989, 1991 y 1993, así como la comparación del sistema con los de las firmas DuPont y Diagnostic Pasteur en un grupo de 467 sueros positivos por ELISA. En el estudio de las muestras de la OMS el sistema demostró ser altamente sensible y específico. Al compararlos con los estuches HIV-1 Western blot IgG versión 1.2 (DuPont Company, EE.UU.) y New LAV-blot 1 (Diagnostic Pasteur, Francia) tuvo una coincidencia del 100 y 97 %, respectivamente.

Se evaluaron con el método de WB 527 muestras de suero humano, 60 de ellas pertenecientes a los paneles 1 (1989), 2 (1991) y 5 (1993), enviadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) al Laboratorio Nacional de Referencia del SIDA (LNRS) para el aseguramiento de la calidad en el diagnóstico serológico de anticuerpos al VIH. El resto de las muestras (467) era reactivo según el ELISA "Vironostika" (Organon Teknika, Holanda). Todas las muestras fueron analizadas por el sistema DAVIH-BLOT (Laboratorios DAVIH, Cuba).<sup>9</sup> De las 467 muestras reactivas por ELISA, 332 fueron seleccionadas al azar y se analizaron por el sistema HIV-1 Western Blot IgG versión 1.2 (DuPont Company, EE.UU.) y las 135 restantes por New LAV blot 1 (Diagnostic Pasteur, Francia). El criterio de interpretación utilizado fue el recomendado por cada fabricante. Los sistemas New LAV blot 1 y DAVIH-BLOT comparten el mismo criterio de positividad de la OMS,<sup>10</sup> que considera una muestra positiva si tiene al menos 2 bandas del gen ENV; y en el de DuPont cuando están presentes las p24, p31 y gp41 o gp120/160. La interpretación se define como positiva (P) si la muestra cumple con los criterios anteriormente señalados, negativa (N) si

no hay bandas presentes o sólo aparece la p17, e indeterminada (I) si los perfiles de las bandas no clasifican las muestras como positivas o negativas. (Pérez, 1998)

“posible infección reciente por VIH en pacientes negativos por western blot, con prueba presuntiva de iv generación reactiva por antígeno p24”

Mientras exista ventana inmunológica en la detección de la infección por el VIH, nunca podrá tenerse la certeza de ausencia de infección reciente en una persona con diagnóstico confirmado negativo, más aún, si se obtuvo un resultado reactivo por antígeno p24 en la prueba de tamizaje.

En dicha investigación se seleccionaron 253 muestras de personas que presentaron resultado reactivo para VIH en prueba de tamizaje (presuntiva) y negativo por Western Blot (confirmatoria); se escogieron aquellas que fueron reactivas por antígeno p24 del VIH, con ayuda de una prueba combinada Ag/Ac (IV generación) y una confirmatoria para p24. En aquellos pacientes con resultado positivo para prueba presuntiva de p24 se encontró una seroconversión del 60%; entre los que tuvieron el mismo resultado, pero para prueba confirmatoria de p24, la seroconversión alcanzó el 75%, permitiendo establecer la necesidad de realizar pruebas diagnósticas adicionales a todas las personas con prueba presuntiva reactiva y confirmatoria negativa para el VIH, tendiente a establecer la posibilidad de una infección reciente por este virus.

En esta investigación se llegó a la conclusión de que de acuerdo con sus resultados se puede decir, que por cada muestra con resultado negativo por prueba confirmatoria realizada, se obtuvieron 4.3 con resultado positivo. La frecuencia de un resultado reactivo por prueba presuntiva y negativo por Western Blot en las muestras recibidas es de 6.4 por cada 10000. De las 245 muestras procesadas por presuntiva de antígeno P24, el 4.9% (12 muestras) obtuvo un resultado positivo el 95.1 % (233 muestras), negativo.

De acuerdo con lo anterior, la frecuencia de muestras reactivas para p24 y negativas para prueba confirmatoria (Western Blot) fue de 3.1 por cada

100000 tamizadas. En el 66.7% de las muestras procesadas para confirmación de antígeno p24 se confirmó su presencia. (Núñez-Forero, et al, 1998)

“Evaluación de la respuesta IgG Anti-Toxoplasma y su avidéz por Western-Blot en pacientes infectados por VIH”

Se utilizó la técnica de Western Blot IgG anti- Toxoplasma en 25 casos con VIH y 8 sueros control de pacientes sin infección por VIH, con la finalidad de evaluar la respuesta humoral en estos pacientes, porque la toxoplasmosis cerebral es una patología frecuente en ellos. Los pacientes se dividieron en 3 grupos: 14 casos VIH positivo con toxoplasmosis cerebral y títulos serológicos IgG anti- Toxoplasma ; 11 casos VIH positivo sin toxoplasmosis cerebral y con títulos IgG anti- Toxoplasma ; y 8 pacientes VIH negativos con títulos IgG anti- Toxoplasma . Se encontró que a mayores títulos séricos de IgG anti- Toxoplasma mayor número de bandas en el western-blot. La intensidad de las bandas medida por densitometría varió de manera significativa para las proteínas de 66 y 31 kDa. Los



resultados señalan que estas proteínas son de interés para evaluar su papel en la reactivación de la toxoplasmosis en los pacientes con infección por VIH. (Sarmiento, 2005)

#### “Falso negativo en la prueba de Western Blot en un paciente con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida”

Se describen un caso de un Hombre de 26 años, heterosexual, casado, laboralmente activo, que consultó en la ciudad de Medellín por cuadro de diarrea, pérdida de peso y fiebre subjetiva de cinco meses de evolución. Al interrogatorio se encuentra como factor de riesgo para la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) promiscuidad con un número aproximado de 15 parejas sexuales, asociado al uso ocasional de preservativo. Además, hace cuatro años recibió una transfusión posterior a una herida por arma de fuego. Examen físico sin hallazgos relevantes. Teniendo en cuenta los antecedentes personales, se ordenó una prueba presuntiva para la infección por el VIH. La prueba utilizada, un ensayo inmunoenzimático (ELISA), detecta anticuerpos totales y/o antígeno p24, y fue reportada como reactiva el 19 de septiembre de 2002. Se realizó la prueba confirmatoria Western Blot cuyo resultado fue indeterminado. Se repitió la prueba de tamizaje (ELISA Anti-VIH/Ag p24) dos meses después y nuevamente fue reportada como reactiva el día 20 de noviembre de 2002, pero la prueba confirmatoria Western Blot fue negativa

Este caso ilustra la dificultad diagnóstica que puede presentarse al enfrentar un paciente con sospecha de la infección por el VIH, pero con un resultado de laboratorio contrario. ha lo esperado a El diagnóstico de la infección por el VIH es el resultado de la integración de tres criterios básicos: el clínico, el epidemiológico y el de laboratorio. Las pruebas de laboratorio son un complemento al diagnóstico realizado por el clínico y por esta razón, el criterio clínico epidemiológico debe integrarse con el resultado de laboratorio, en especial cuando este no es coherente con la sospecha diagnóstica. Hay situaciones en las cuales las personas pertenecen a un grupo de bajo riesgo y sin embargo, pueden estar infectadas. En este caso el resultado de laboratorio positivo tiene validez diagnóstica suficiente. (Hoyos, 2007)

#### “Identificación de mujeres embarazadas infectadas por el VIH-1: significado de pruebas serológicas Indeterminadas”

Tuvo como objetivo Investigar el significado de ensayos de screening positivos y western-blot indeterminados en la cual Realizaron un estudio de diagnóstico de infección por VIH en una gestante primípara y tres multíparas, de edades entre 26 y 32 años, con ensayos de screening VIH-positivos. Ninguna refirió prácticas de riesgo para la infección por VIH. Utilizaron técnicas de detección directa del VIH: antigenemia p24 y carga viral en plasma y detección del provirus por PCR, cultivo viral y cuantificación de células T CD4+ en células mononucleares de sangre periférica. En mujeres embarazadas

En resultado fue impactante Ninguna de las gestantes con ensayos de screening positivos y western-blot indeterminados estaban infectadas por el VIH. Y se concluyó que era

necesario realizar ensayos de detección directa del VIH para un diagnóstico definitivo. (Correa, 1999)

### **Guía Práctica Clínica Del Manejo Del VIH**

Las guías de práctica clínica son un conjunto de recomendaciones desarrolladas sistemáticamente para asistir a los profesionales de la salud en la toma de decisiones apropiadas sobre el cuidado de la salud, en circunstancias clínicas específicas. Las guías se diseñan para ayudar a asimilar, evaluar y aplicar la mejor evidencia y opinión en la práctica, para la toma de decisiones no sólo por parte del profesional sino por el paciente. La guía tiene el potencial de mejorar la calidad de la atención y la utilización racional de recursos en el cuidado clínico; contribuyen en la disminución de la variabilidad de la práctica clínica, fomentan la toma de decisiones clínicas bien informadas con base en la evidencia científica y permiten mejorar los resultados en salud de los pacientes. Asimismo se espera que la guía contribuya al logro de los objetivos establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas

- NOM-010-SSA2-1993 *Norma Oficial Mexicana Para La Prevención Y Control De VIH*
- NOM-017-SSA2-1998 *Para La Vigilancia Epidemiológica*
- NOM-039-SSA2-2002 *Para La Prevención Y Control De Enfermedades De Transmisión Sexual*
- NOM-166-SSA1-199 *Para La Organización Y Funcionamiento De Los Laboratorios Clínicos*
- NOM-168-SSA1-1998 *Del Expediente Clínico*

#### **Diagnóstico y detección**

La detección precoz de la infección del VIH es crucial para el individuo y para la comunidad. Para el individuo, porque permite el seguimiento cercano y el inicio de terapias que tienen impacto favorable en la calidad y cantidad de vida. Para la comunidad, porque permite adelantar actividades de prevención secundaria de la transmisión. Adicionalmente, las actividades inherentes al proceso diagnóstico (asesoría) pueden tener un impacto favorable en la prevención primaria de la transmisión del VIH y otras infecciones de transmisión sexual (ITS). (INDRE (1998))

#### **Consideraciones generales**

Los principios generales que deben respetarse para la asesoría y actividades dirigidas a la detección del VIH son: la confidencialidad y el consentimiento informado por escrito (debe ser voluntario, libre de coerción, debe usar lenguaje sencillo y fácil de entender).

La asesoría debe ser realizada por un trabajador del sector salud con adecuada capacitación, entrenamiento y certificación, y debe incluir asesoría acorde con el sexo, edad, orientación sexual y cultural del individuo. (INDRE (1998))

### Prueba de tamizaje de Detección

Son pruebas que muestran una sensibilidad de más del 99%. Adicionalmente, tienen una altísima especificidad (también mayor al 99%) pero a pesar de ello la frecuencia de resultados falsos positivos puede ser relevante si se realiza en poblaciones de baja prevalencia. Por lo tanto las pruebas de tamizaje requieren ser repetidas y confirmadas. Las pruebas de tamizaje incluyen las pruebas serológicas de ELISA y las pruebas rápidas de detección.

Las pruebas de ELISA requieren una complejidad de laboratorio alta, mientras las pruebas rápidas solamente requieren una complejidad de laboratorio intermedia

El enzimoimmunoanálisis es el método más utilizado como prueba de detección, los antígenos provienen del lisado viral de un cultivo. Los inmunoanálisis actuales son más sensibles y sobre todo más específicos que los anteriormente utilizados. Estos pueden presentar falsos positivos, sobre todo

En pacientes con enfermedades autoinmunes y con determinados fenotipos, las pruebas de Enzimoimmunoanálisis utilizan viriones desestructurados mediante detergentes y absorbidos en pocillos. Sobre ellos se añaden el suero problema, y más adelante, una anti globulina humana de tipo IgA, IgM e IgG a la que se le ligó una enzima, que proporciona color al añadir un sustrato en los casos positivos. En la actualidad existen más de 130 tipos de pruebas comerciales para la detección de anticuerpos frente al VIH-1 en sueros las cuales gozan de excelente sensibilidad, el equipo para el Enzimoimmunoanálisis utilizado en el Laboratorio Estatal de Salud Pública en el área de Serología Epidemiológica es el equipo GENSCREEN TM HIV 1/2 VERSION 2

### Interpretación del ELISA

Si el resultado de la prueba de tamizaje para VIH es no reactivo (negativo) se considera que el individuo no está infectado, salvo en los casos en que se sospeche una infección reciente por posible exposición de riesgo en los seis meses previos a la prueba. Dada la altísima sensibilidad, no necesita repetirse las pruebas en individuos sin posible exposición reciente.

En individuos con una historia reciente de exposición a VIH o exposición de riesgo, no se puede excluir la infección sin hacer seguimiento hasta seis meses después de ocurrida dicha exposición.

Si la tercera prueba resulta no reactiva (negativa), el paciente se puede manejar como presuntivo negativo y no requiere prueba confirmatoria.

Si el resultado es reactivo (positivo) se repite la prueba de tamizaje, con nueva muestra.

Si las dos pruebas de tamizaje son reactivas se debe confirmar el resultado mediante la realización de una prueba confirmatoria.

Si la prueba de tamizaje repetida es no reactiva (negativa), se debe repetir nuevamente la prueba de tamizaje.

Si la tercera prueba de tamizaje es reactiva (es decir, dos de tres pruebas reactivas/positivas) se debe confirmar el resultado mediante una prueba confirmatoria. (INDRE, 1998)

Prueba de Detección Confirmatoria

Las pruebas confirmatorias tienen altísima especificidad, conservando una muy alta sensibilidad. La frecuencia de falsos positivos con las pruebas confirmatorias es extremadamente rara, del orden de 0.0004% a 0.0007% (34,35) e incluyen auto anticuerpos, vacunas para VIH o resultados ficticios. Estas pruebas deben realizarse cuando las pruebas de tamizaje hayan resultado repetidamente positivas únicamente. Las pruebas confirmatorias más usadas utilizan son los métodos de Western Blot.

El WESTERN BLOT (WB) De modo ventajoso permite discriminar frente a que antígenos virales se dirigen los anticuerpos presentes en la muestra problema. Otras metodologías de confirmación como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) presentan gran subjetividad y gran complejidad lo que dificulta su utilización sistemática como pruebas de confirmación.

En 1987 la FDA propuso criterios de positividad del WB muy restrictivos: solo debían considerarse positivas las muestras con bandas al menos frente a una proteína de cada uno de los 3 genes estructurales. Las especificidad de los criterios de la FDA es muy elevada aunque su escasa sensibilidad proporciona un inaceptable numero de resultados indeterminados. (INDRE, 1998)

En 1989 la CDC reviso los criterios de positividad del WB que se definieron por la existencia de al menos 2 de las 3 bandas correspondientes a los genes etructurales que codifican las proteínas p24, gp41 gp120/gp160, estos criterios ofrecen mayor sensibilidad conservándose la especificidad. A partir de entonces los criterios de interpretación han sido propuestos con diferentes bandas.

HIV WESTERN BLOT STRIP		AFR	AUS	FDA	RCX	MEX	CDC 1	CDC 2	CON	GER	UK	FRA	MAC
ENV	p160												
	p120	ANY 2	ANY 1	ANY 1	ANY 1	p160/ p120 AND p41	p160/ p120 AND p41	p160/ p120 OR p41	p160/ p120 OR p41	ANY 1	ANY 1	ALL 3	
	p41												
POL	p68												
	p53		ANY 3 GAG OR POL		p32	ANY 1			p32			ANY 1	
	p32			AND	AND			AND	OR	ANY 1 GAG OR POL	AND	OR	
GAG	p55												
	p40												
	p24			p24	ANY 1			p24	p24		p24	ANY 1	
p18													
3 WEAK BANDS OR ANY STRONG BAND													

Figura 8. criterios de interpretacion

Si la prueba confirmatoria es positiva se considera al individuo como infectado por VIH. Algunas veces, individuos doblemente reactivos/ positivos por pruebas de tamizaje tienen pruebas confirmatorias indeterminadas debido a una respuesta incompleta ante la infección por VIH o reacciones inespecíficas en personas no infectadas.

La mayoría de personas con Western Blot indeterminado e infectadas con VIH desarrollan anticuerpos detectables al mes.

En estos casos se debe recolectar una segunda muestra después de uno tres meses para repetir la prueba de Western Blot.

Si la prueba continúa indeterminada después de uno a tres meses es muy poco probable que el individuo tenga infección por VIH y se debe considerar como no infectado a menos que haya tenido exposiciones recientes de riesgo.

Para evitar diagnósticos equivocados como resultado de errores en el manejo de la muestra, se recomienda que se hayan tomado al menos dos muestras de sangre diferente del mismo paciente a lo largo del proceso diagnóstico (v.g. una muestra para prueba de tamizaje inicial, una segunda muestra para prueba de tamizaje repetida y prueba confirmatoria; o una muestra para prueba de tamizaje inicial y repetida y una segunda muestra para prueba confirmatoria).

Solamente en circunstancias excepcionales (neonato-lactante, síndrome retroviral agudo o agamaglobulinemia, excepcionalmente en la gestante) se debe utilizar como alternativa un método de detección de ácido nucleico (ARN viral ó método de amplificación de ADN proviral), teniendo en cuenta la frecuencia alta de falsos positivos y el costo (ver indicaciones).

No se recomienda realizar Western Blot sin haber hecho antes las pruebas de tamizaje.

#### Solicitud periódica de pruebas diagnósticas

La solicitud en forma periódica de las pruebas diagnósticas es recomendada para personas que presentan exposiciones de riesgo recientes o repetidas y, aunque la frecuencia es arbitraria, se recomienda anualmente, teniendo en cuenta que las tasas de seroconversión anual varían desde 0.001% en la población general hasta 6% en individuos con exposiciones repetidas de riesgo. Otros factores que se deben tener en cuenta en el momento de repetir las pruebas son el tiempo de la última exposición potencial, probabilidad de infección dado el tipo de exposición, presencia o probabilidad de continuar con comportamientos de riesgo, probabilidad para regresar a asesoría o seguimiento de las pruebas de VIH, ansiedad del individuo y los recursos económicos del sistema. También se recomienda la repetición de la prueba diagnóstica a los tres y los seis meses en individuos que han tenido exposición ocupacional y no ocupacional de riesgo. (INDRE, 1998)

Detección en el adolescente y el adulto (no gestante) asintomático.

Para la detección de pacientes adolescentes y adultos asintomáticos pueden existir diferencias en ciertos grupos poblacionales con mayor prevalencia o mayor vulnerabilidad como hombres que tienen sexo con hombres, pacientes renales crónicos que inician hemodiálisis, trabajadores sexuales, usuarios de drogas intravenosas y, posiblemente, personas institucionalizada.

En pacientes adolescentes y adultos asintomáticos se realiza una consulta con un médico encargado del programa VIH/SIDA, quien le realiza un examen físico, y decide si es recomendable realizar pruebas diagnósticas para VIH.

Pruebas presuntivas (de tamizaje) recomendadas

- Utilice ELISA. Haga uso de pruebas rápidas en exposición de riesgo y en circunstancias en las que la complejidad requerida para las pruebas de ELISA es inexistente (de acuerdo con el algoritmo)
- En exposición de riesgo se recomienda el uso de una prueba rápida, previa asesoría, para la fuente, si la fuente está disponible y no se conoce su estado serológico. Al expuesto se le puede realizar la prueba rutinaria de ELISA o la prueba rápida.

Pruebas confirmatorias recomendadas

- Se recomienda Western Blot o IFI como pruebas confirmatorias en todos los casos en los que pruebas de tamizaje repetidas hayan resultado positivas (reactivas)

Pruebas presuntivas de tamizaje recomendadas

- Utilice ELISA o pruebas rápidas, excepto en paciente con cuadro clínico compatible con síndrome retroviral agudo o paciente con diagnóstico de agamaglobulinemia. Utilice pruebas rápidas en circunstancias en las que la complejidad requerida para las pruebas de ELISA es inexistente
- En exposición de riesgo se recomienda el uso de una prueba rápida para la Fuente, si la fuente está disponible. Al expuesto se le puede realizar la prueba rutinaria de ELISA o la prueba rápida
- En el individuo con síndrome retroviral agudo y en pacientes con agamaglobulinemia, utilice pruebas de detección de VIH basadas en ácidos nucleicos

Pruebas confirmatorias recomendadas

- Se recomienda Western Blot o IFI como pruebas confirmatorias en todos los casos en los que pruebas de tamizaje repetidas hayan resultado positivas (reactivas). (INDRE, 1998)

Indicaciones de referencia–Interconsulta a experto en VIH/sida o enfermedades Infecciosas.

Cada vez que el médico encargado del programa lo considere necesario.

1. Coinfección con hepatitis B.
2. Coinfección con hepatitis C.
3. Coinfección con tuberculosis.
4. Segundo fracaso terapéutico en adelante.
5. Intolerancia severa a más de dos regímenes.
6. Paciente con comorbilidades que requieran la administración de múltiples medicamentos con potenciales interacciones medicamentosas significativas.
7. Síndrome de hiperlactatemia.
8. Interpretación de pruebas de genotipificación.
9. Exposición de riesgo ocupacional y no-ocupacional (la evaluación del experto nunca debe retrasar el inicio de la profilaxis post-exposición de estar indicada).

*(INDRE, 1998)*

**VIH El Personal Sanitario (NOM-003-SSA-1993, NOM-039-SSA2-2002, NOM-166-SSA1-1999)**

La sangre contaminada es la fuente principal del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a partir de la cual puede infectarse un profesional sanitario. Las formas potenciales de transmisión del VIH son similares a las de otro virus mucho más conocido como el de la Hepatitis B.

Solo se ha comprobado la trasmisión de VIH en personal sanitario a partir de sangre, líquidos corporales contaminados con sangre o concentrados de virus que fueron inoculados o tuvieron contacto con mucosa o piel no intacta.

La capacitación en el manejo de muestras de VIH es de vital importancia en el LESP pues hasta 2002 se tienen registrados por la CDC de Estados Unidos un total de 57 seroconversiones tras exposición ocupacional (personal sanitario, médico y Laboratorista) en las que 26 estaban en fase de SIDA. En 49 casos la exposición fue a Sangre, en 3 a virus concentrado en laboratorio, en 1 líquido hemorrágico, en 4 no se especificó el fluido, cabe mencionar que el área de Serología epidemiológica se recibe muestras tanto de

sangre como de plasma, colocando a los analistas en todos los posibles riesgos antes mencionados. Otros 139 casos de infección por VIH o SIDA fueron reportados en personal sanitario que no presentaba otros factores de riesgo y refería exposición accidental.

Las recomendaciones que la CDC efectúa para los profesionales sanitarios y técnicos laboratoristas involucrados en las técnicas invasivas son:

- Respetar cuidadosamente todas las precauciones universales
- Las personas que sepan que están infectados por VIH no deben técnicas diagnósticas, a menos que obtengan el consentimiento de un comité de expertos nombrados por el propio centro de trabajo, el cual elaborara de forma individualizada cada caso
- Existe una relación directa entre la magnitud del accidente y las posibilidades de seroconversión, cuanto mas grave es el accidente mas fácil es que se produzca la infección; el uso de Zidovudina (AZT) como profilaxis tras exposición se asocia con una reducción de hasta 81% del riesgo de infección por VIH.

(Artigas, 2005)

### **Precauciones En El Area De Serología Epidemiologica Del Laboratorio Estatal De Salud Pública (Lesp) (NOM-010-SSA2-1993)**

La sangre y otros líquidos corporales de todos los pacientes se consideran potencialmente infecciosos. De forma complementaria a las precauciones universales se realizan una serie de precauciones que profesionales asignados al diagnóstico e investigación en el área de serología epidemiológica realizan permanentemente.

- Todas las muestras de sangre y líquidos corporales se colocan en contenedores adecuados con un cierre de seguridad para prevenir su derrame durante el transporte; se tiene cuidado al colocar cada muestra en el contenedor para evitar la contaminación.
- Todas las personas involucradas en el procesamiento de sangre utilizaran guantes. La mascarilla y las gafas protectoras se utilizaran si es previsible un posible contacto con mucosas. Después de completarse el procesamiento de las muestras se debe de proceder a cambiarse los guantes y lavarse las manos.
- Siempre que sea necesario el pipeteado de muestra, este se realizara de manera mecánica y nunca por la boca
- La utilización de jeringas y agujas debe limitarse siempre a casos que no exista alternativa.
- La superficie de trabajo deberá ser descontaminada con germicida liquido apropiado antes y después de realizado el trabajo.
- Después de completar su actividad en el laboratorio todas las personas deberán lavarse las manos y quitarse todo en quipo protector antes de salir del área de trabajo.

(Artigas, 2005)



### **Protocolo Después De Un Posible Contagio Accidental**

**(NOM-003-SSA-1993, NOM-166-SSA1-199, NOM-087-ECOL-SSA1-2001)**

En caso de un accidente, y si la herida sangra deberá permitirse el sangrado de forma profusa, eliminar sus posibles cuerpos extraños y lavar con agua y jabón, no debiendo retrasar esta maniobra para utilizar antisépticos, es preciso evitar maniobras agresivas como frotar bruscamente la zona afectada, esto para no producir erosiones que favorezcan la infección así como la utilización de agentes cáusticos o la inyección de antisepticos, se han de efectuar enjuagues con agua limpia y si se afecta la conjuntiva, se a de realizar irrigaciones con agua estéril. De inmediato hay que proceder a una valoración clinicoserológica con el fin de descartar o confirmar la infección por VIH y valorar la indicación de profilaxis postexposición en caso de serología positiva conocida se recogerán los siguientes datos: estado clínico, CD4+ , carga viral plasmática, tratamiento antirretroviral previo (si existiera), y estudio de resistencia potencial para ajustar la profilaxis postexposición al caso fuente.

Si se decide realizar la Quimioprofilaxis, debe hacerse lo antes posible, preferiblemente durante las 1-2 primeras horas tras el accidente cuando la probabilidad de la infección por VIH sean altas y siempre que se asegure un buen cumplimiento. La profilaxis no deberá usarse cuando el riesgo de infección sea bajo o haya pasado más de 72 horas.

*(Artigas, (2005))*

## 8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

### Visita al CAPASITS

Por los tiempos tan prolongados que requiere el presente proyecto era necesario preparar todo con tiempo de antelación para poder encontrar voluntarios puesto que estos eran cruciales y debían de reunir ciertas características además de dar su autorización para realizar el proyecto, los requisitos que debían reunir los voluntarios eran:

- Ser residente de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez
- Estar en el periodo de ventana de la enfermedad y haber dado un resultado indeterminado.
- Contar con la atención del CAPASITS
- Dar su consentimiento para la evaluación y el seguimiento de su caso respetando en todo momento su confidencialidad.
- No ser consumidor de Drogas inyectables no ejercer la prostitución o actividad de alto riesgo.
- No ser un paciente politransfundido.

La función que se realizaría en el Centro Ambulatorio para la Prevención y Atención de personas con Sida e ITS (CAPASITS) Jurisdicción sanitaria No.1 es la de la búsqueda de candidatos que cumplieren con los requisitos del proyecto y proporcionaran su valioso apoyo siempre cuidando la confidencialidad.

Tomando en cuenta el manejo de pacientes según la norma

NOM-010-SSA2-1993 Norma Oficial Mexicana Para La Prevención y Control De VIH

Que indica que la notificación de casos de VIH/SIDA se hará de manera confidencial. Su objetivo es contar con la información necesaria para establecer las medidas de prevención y control de enfermedades transmisibles, y debe proteger al afectado contra daños a su honorabilidad y dignidad, por lo que no debe comunicarse a otras personas o autoridades, excepto las directamente responsables de la vigilancia epidemiológica, sin menoscabo de la orden judicial la cual deberá acatarse en todo momento.

El seguimiento epidemiológico de infectado por VIH o de caso de SIDA, se realizará por el epidemiólogo de la unidad de vigilancia epidemiológica del nivel técnico-administrativo correspondiente, en el espacio diseñado para este fin en los formatos de notificación del Sistema Nacional de Salud. Este seguimiento deberá efectuarse cada año para los infectados por VIH, y cada seis meses para los casos de SIDA.

Las etapas para seleccionar a un paciente se representan en la figura 9, en el cual se ven los filtros en la selección de Voluntarios y etapas del estudio.

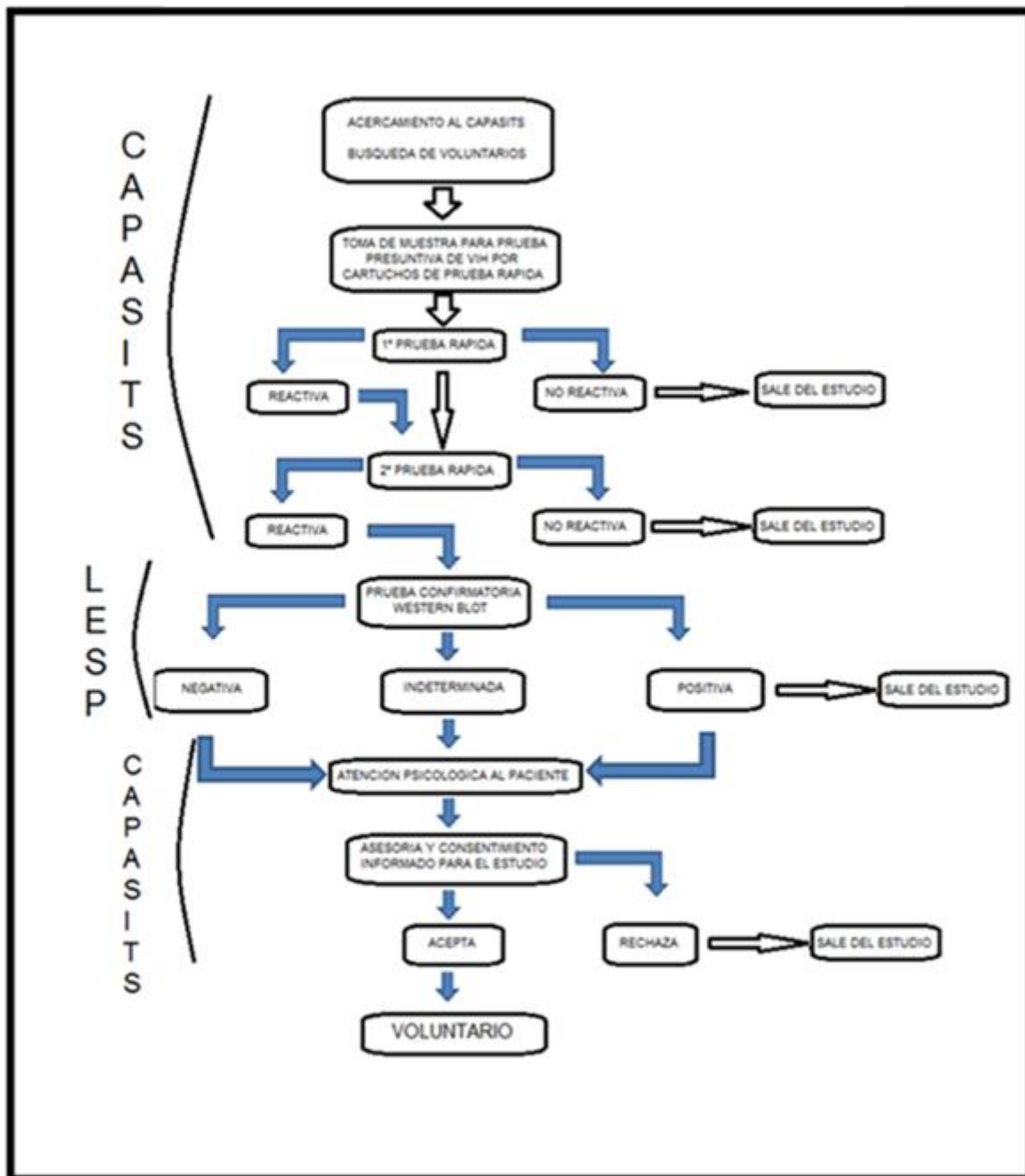


Figura 9. selección de pasos de estudio

Secuencia de pruebas realizadas a voluntarios seleccionados se resume en la Figura 10, en el cual se puede observar las etapas del desarrollo del estudio, en las cuales se espera obtener resultados reactivos en prueba de tamizaje, y negativas o indeterminadas en pruebas confirmatorias, para poder así, continuar a las etapas finales del estudio.

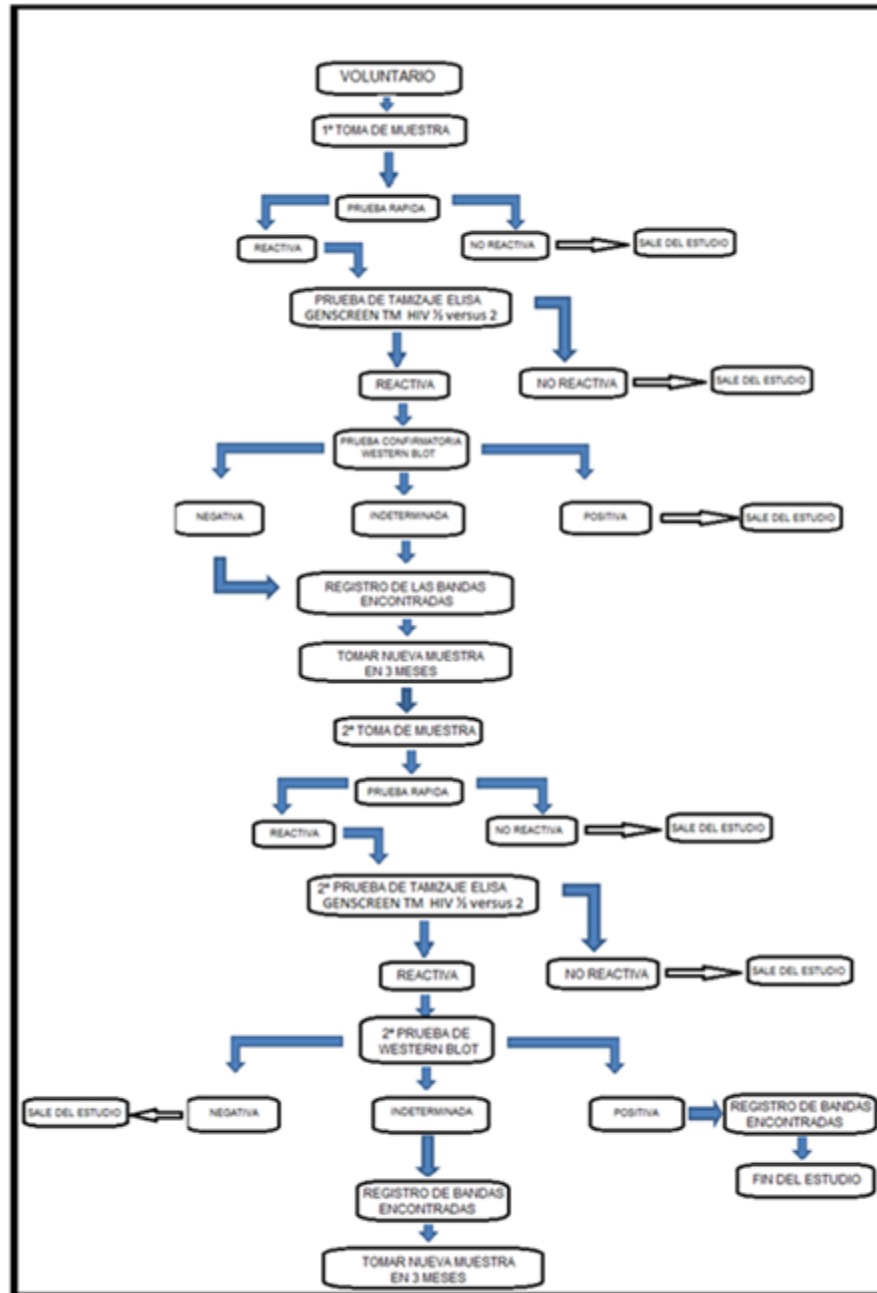


Figura 10, Secuencia de Pruebas y Desarrollo del Estudio.

Continuación del diagrama de flujo. En la que se observa las últimas etapas del estudio, en la cual se espera obtener pruebas confirmatorias positivas dando así fin al estudio.

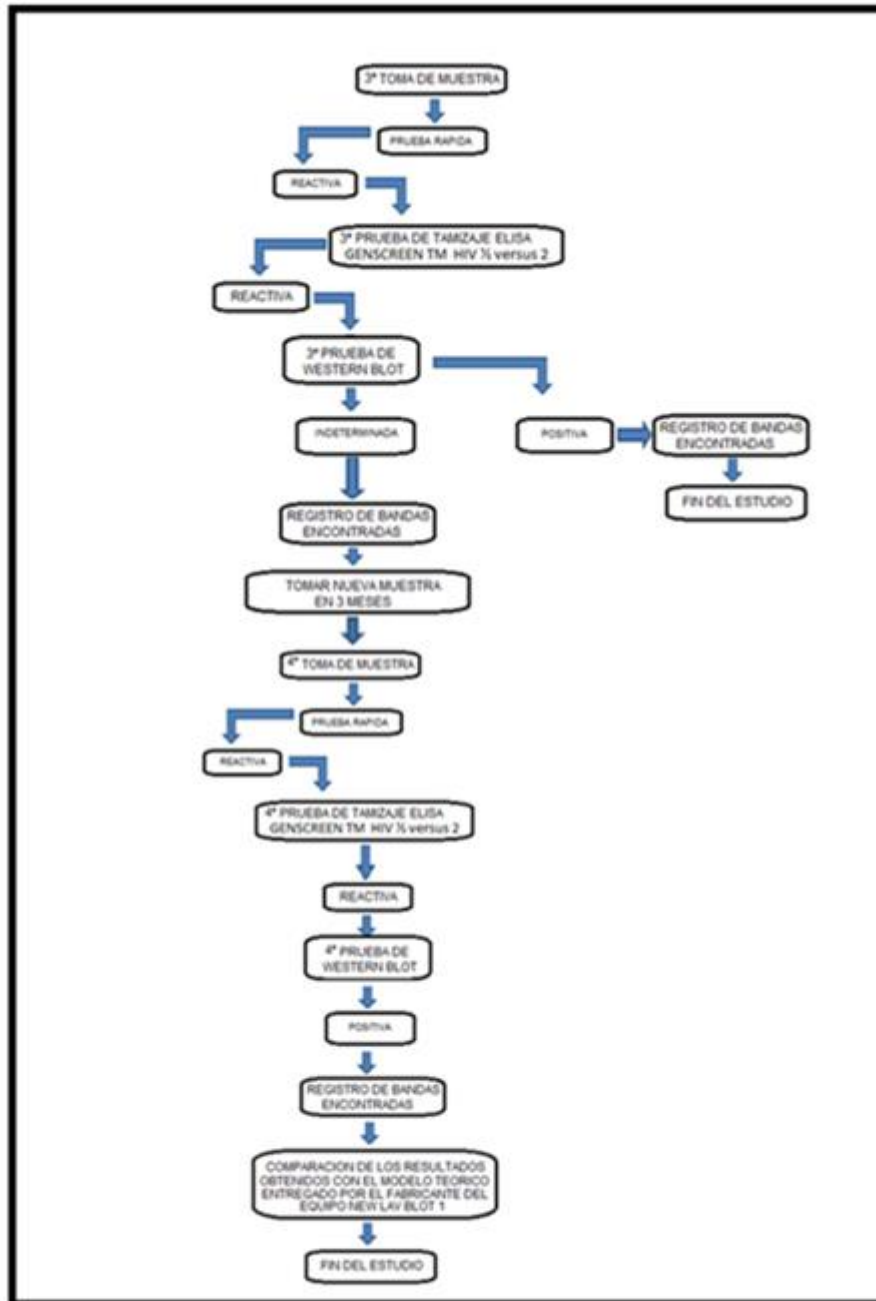


Figura 11. Continuación del diagrama de flujo Últimas Etapas del Estudio realizado a los voluntarios 01-022-10-CAPA, y 01-032-11-CAPA.

### Método

Pacientes: se seleccionaron 2 voluntarios de un total de 10 personas del programa VIH/SIDA procedentes del CAPASITS Tuxtla con muestras reactivas en la prueba presuntiva para VIH e indeterminada o negativas por Western Blot, Los pacientes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio y se recolectaron datos en un formato de historia clínica en el cual se consignó la información siguiente: identificación, datos clínicos, edad, sexo, orientación sexual, estado civil, ocupación, el tiempo que a transcurrido desde su posible contagio, entre otras. Los detalles se presentan en la Tabla 1. En la cual se pueden observar el tipo de estudio, la población de estudio, los criterios para la inclusión al estudio y procedencia de los voluntarios, además se presenta en la Tabla 2. Las características de los Voluntarios del estudio.

Tabla 1. Tipo de estudio y Criterio de selección

Tipo de estudio	Mecánica de campo
Población de estudio	Pacientes con prueba rápida reactiva, y confirmatoria indeterminada o negativa
Criterios de inclusión	Pacientes en etapa de ventana inmunológica
Procedencia de pacientes	Capasits Tuxtla Gutiérrez

Tabla 2. Características de los Voluntarios a estudio

Características	Voluntario 1 01-022-10-CAPA	Voluntario 2 01-032-11-CAPA
Sexo	Femenino	Masculino
Edad	27 Años	19 Años
Ocupación	Ama De Casa	Desempleado
Estado Civil	Casada	Soltero
Orientación Sexual	Heterosexual	Bisexual
Uso De Preservativo	No	Ocasionalmente
Consumo De Drogas	No	No
Transfusiones De Sangre	No	No
Hemofílico	No	No
Tipo De Pareja Sexual	Estable	Múltiples
Parejas Sexuales En Los Últimos 12 Meses	1 Pareja	Más De 10 Parejas
Tipo De Muestra A Analizar	Plasma 1 MI	Plasma 1 MI

### **Toma De Muestra**

La toma de muestra se realiza conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993, "Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos". Es por ello que la toma de muestra de los dos voluntarios se realizó con los equipos de protección indicados en la Norma Oficial Mexicana así como también bajo la supervisión del asesor externo, en el transcurso del estudio, se realizaron un total de 6 tomas de muestra, de las cuales tres fueron al voluntario 01-022-10-CAPA, con un periodo de 2 meses de tiempo entre una y otra; y dos al voluntario 01-032-11-CAPA con un periodo de 3 meses de tiempo entre cada toma de muestra.

El total de muestra sanguínea en cada toma fue de 2 ml, de esta obtendremos 1 ml de plasma para la realización del estudio, a continuación se procede a la realización de la prueba rápida.

### **Realización De Prueba Rápida**

Una de las pruebas presuntivas utilizadas en la detección del VIH es la "Prueba Rápida" que se basa en la técnica de Inmunoensayo en sándwich de flujo lateral para la detección cualitativa del anticuerpo del VIH en, plasma de cada uno de los Voluntarios.

Aun cuando el voluntario haya resultado con prueba rápida reactiva en el CAPASITS en el Laboratorio Estatal De Salud Pública (LESP) por protocolo debe realizarse el procedimiento paso a paso comenzando con la realización de una prueba rápida con un equipo diagnóstico distinto, en el estudio se presenta la prueba rápida para la detección cualitativa de anticuerpos de virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 en plasma de la marca ACCUTRACK.

Metodología para la Prueba Rápida:

- Se sacó el cartucho de prueba rápida marca ACCUTRACK de su sobre y se coloca en una superficie seca.
- Por protocolo se identifica al cartucho con un número clave en la parte superior del mismo esto para poder identificar la muestra con el cartucho en el que se realiza el diagnóstico.
- Se coloca 30 ul de la muestra del voluntario 01-022-10-CAPA y la del voluntario 01-032-11-CAPA en su cartucho numerado con anterioridad, utilizando una pipeta de plástico. Posteriormente se coloca 50 ul (una gota) de diluyente de muestra.
- Se permite que corra la prueba durante un lapso aproximado de 15 minutos.
- Pasado 15 minutos se procede a interpretar los resultados

### *INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS*

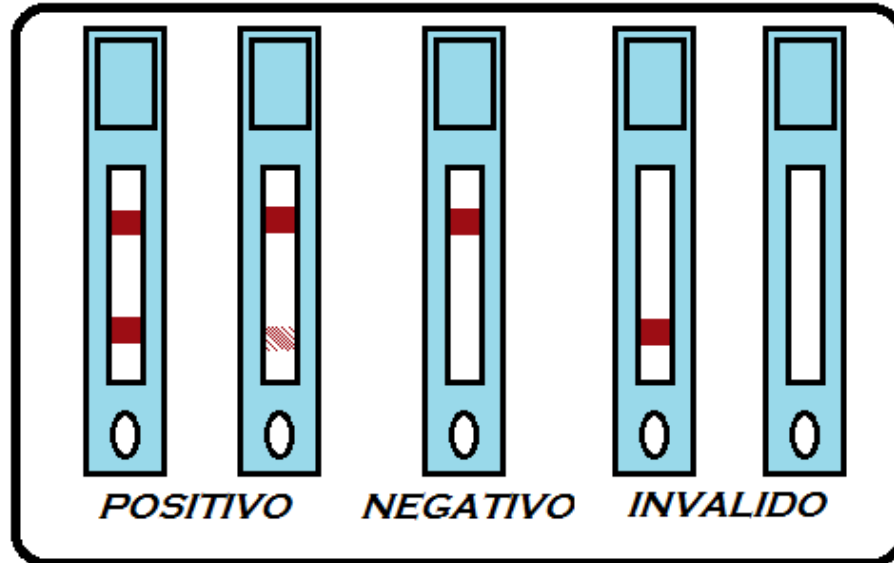


Figura 12. Interpretación de los resultados de Prueba Rápida

**POSITIVO:** ambas bandas de rojo purpura aparecerían en la membrana. Entre más baja sea la concentración de anticuerpos más débil es la coloración de la banda

**NEGATIVO:** solo la banda control rojo purpura aparece en la membrana, la ausencia de una banda de prueba T indica su resultado negativo.

**INVALIDO:** siempre deberá haber una banda rojo purpura en la región de control independientemente del resultado de la prueba. Si la banda control no es visible la prueba se considerara inválida. Repetir la prueba utilizando un dispositivo de prueba.



### **Realización De Prueba Elisa Por El Equipo Genscreen Tm HIV 1/2**

Esta técnica se basa en la detección de anticuerpos anti VIH-1 y anti VIH-2 en el plasma mediante técnica Inmunoenzimática, la sensibilidad de esta prueba es de 7 días posteriores a la infección por el virus del VIH. Al comienzo del procedimiento deben de asignarse las posiciones donde se colocaran tanto la muestra como los controles internos que se manejan en el KIT, los pozos son clasificados, el primero pozo A1 es asignado al Control Negativo CN, los pozos B1,C1,D1 son asignados al Control Umbral CU, el pozo E1 es asignado al Control Positivo

Una vez que las muestras de plasma de los voluntarios resultaran reactivas, son procesadas de acuerdo a la metodología siguiente (*Mendoza, 2011*)

- Se colocan 25 ul del diluyente de muestra en cada pozo
- Posteriormente se procede a colocar 75 ul del plasma del voluntario 01-022-10-CAPA en el pozo F1, y 75 ul del plasma del voluntario 01-032-11-CAPA en el pozo G1
- Se coloca 75 ul de Control Negativo en A1, 75ul de Control Umbral en los pozos B1, C1, D1, seguido de colocar 75 ul del Control Positivo en pozo E1.
- En adelante se cubre la placa con papel adhesivo y se incuba a 37 °C durante 30 minutos
- Después de pasar los 30 minutos se procede a retirar la placa con los pozos, se quita el papel adhesivo y se comienza 3 lavados dejando 30 segundos reposando en cada pozo
- Agregar 100 ul de conjugado a todos pozo
- Cubrir la placa con papel adhesivo e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente
- Quitar el pape adhesivo y realizar 5 lavados dejando dejando 30 segundos de reposo en cada uno.
- Agregar 80 ul de la solución de revelado e incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad sin cubrir con papel adhesivo
- Posteriormente se agrega 100 ul de la solución de paro, y se deja actuar por 4 minutos
- Al termino de los 4 minutos se procede a realizar la lectura a 450 mn/620 nm

Para realizar la interpretación de resultados, se deben de realizar los cálculos del valor de corte, el cual es el valor que determina la frontera entre las muestras reactivas (positiva en ELISA) y las no reactivas (Negativa ELISA), actuando como un calibrador que es procesado a la par de las pruebas; este calibrador es el que va a marcar una longitud de onda tal en un espectrofotómetro que las lecturas que están arriba del punto de corte arrojado por el calibrador se consideran positivos en anticuerpos para VIH y los que están abajo del punto de corte se consideran negativos.

Para obtener el valor de corte se calcula el promedio de la absorbancia por medio de los controles umbrales (C.U.) CUT OFF, refiriéndose a la tabla3.

Tabla 3. Ejemplo de cálculo del Valor de Corte. (V.C.)

Ítem	Absorbancia
Control Negativo: Micro pozo B1	C.N.
Control Umbral 1	C.U. 1
Control Umbral 2	C.U. 2
Control Umbral 3	C.U. 3
Control Positivo	C.P.
Promediar el Control Umbral	$CU = (CU1+CU2+CU3 / 3)$
Valor de corte (el promedio del C.U. dividido en 10)	$V.C. = (CU / 10)$

Una vez obtenido el valor de corte, se procede a realizar la validación de los resultados para ello se requiere comprobar las absorbancias de los Controles Ubrales C.U., Control Positivo C.P., y Control Negativo C.N. como se indica a continuación en la Tabla 4 en la cual se observa los límites de absorbancia que pueden tener cada control para ser válidos.

Tabla 4. Requerimientos De Validación Para Determinar Si Los Resultados Son Válidos.

Controles De La Prueba	Absorbancia en margen de espectrofotométrico (450nm a 620nm)
Control Negativo	La absorbancia debe ser menor a 0.500 nm
Control Umbral	La absorbancia debe ser mayor a 1 nm y menor a 2 nm
Control Positivo	La absorbancia debe ser mayor a 2 nm

### Interpretación de Resultados.

NO REACTIVO: Especímenes con absorbencias por debajo del valor Cut-Off se consideran no reactivos para los anticuerpos VIH-1, VIH-2 y / o subtipo O pueden reportarse como negativos.

REACTIVO:\* Especímenes con absorbencias iguales o mayores que el valor Cut-Off se consideran

\*NOTA: Especímenes con valores dentro de  $\pm 10\%$  del valor Cut-Off deben reexaminarse en duplicado para su interpretación final.

### **Realización De La Prueba De Confirmación Western Blot Con El Equipo New Lav Blot 1**

Esta prueba se basa en la confirmación y detección de anticuerpos anti-VIH-1 en plasma mediante Inmunotransferencia en continuación a las pruebas presuntivas reactiva realizadas anteriormente.

Una vez que las muestras de plasma de los voluntarios resultaran reactivas por las Pruebas Presuntivas de ELISA, estas deberán ser analizadas por la prueba confirmatoria de Western Blot, utilizando el equipo New Lav Blot 1.

Para la realización de la prueba confirmatoria con el equipo New Lav Blot 1, se realiza los siguientes pasos.

- Se enumera las tiras y se asigna a cada muestra a diagnosticar. Por el alto costo de los reactivos que se utilizan en esta prueba se requiere un mínimo de 10 muestras para correr la prueba confirmatoria.
- Se colocan las tiras a utilizar en el RACK y se añaden 2 ml de solución de lavado /diluyente reconstituida (1: 5) a cada compartimento a utilizar, se incuba 5 minutos en agitación lenta
- Se añade de manera manual 20 ul de cada muestra y se procede a incubar un lapso de 2 horas a temperatura ambiente con agitación lenta.
- Después del lapso de 2 horas de incubación se procede a aspirar el contenido de cada compartimento utilizado.
- Se lava cada tira con 2 ml de solución de lavado reconstituida y se elimina inmediatamente por aspiración
- Se lava 3 veces por 5 minutos en agitación lenta, cada tira, con 2 ml de solución de lavado, y se elimina la solución del ultimo lavado
- Se agrega 2 ml de solución de conjugado por compartimento, incubar una hora a temperatura ambiente bajo agitación lenta.
- Después del lapso se procede a aspirar el contenido de cada compartimento utilizado
- Se lava cada tira con 2 ml de solución de lavado reconstituida y se elimina inmediatamente por aspiración
- Se lava 3 veces por 5 minutos en agitación lenta, cada tira, con 2 ml de solución de lavado, y se elimina la solución del ultimo lavado
- Se agrega 2 ml de la solución de revelado por compartimento, se incuba en agitación lenta y se vigila la aparición de color. Se debe de poder visualizar las bandas correspondientes a las proteínas virales, en un tiempo aproximado de 5 minutos
- A termino de los 5 minutos, se procede a parar la reacción eliminando la solución de revelado y aclarando las tiras 3 veces con agua destilada.
- Por último se procede a secar las tiras, y a la limpieza del equipo, e interpretar los resultados

En la interpretación de los resultados se toman en cuenta los criterios de positividad aplicados en el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP), los cuales se indican a continuación en la tabla 5.

Tabla 5. Interpretación de los resultados obtenidos, conforme a los criterios del LESP

<b>interpretación</b>	<b>criterio del LESP</b>
Positivo	3 env + 1 cualquiera de pol. y gag.
indeterminado	2 env o menos+ cualquiera de pol. y gag
Negativo	sin bandas bandas no clasificadas

Env= proteína de envoltura

Pol= Proteasas

Gag= Proteína precursora

Lectura:

Para la interpretación de resultados en las tiras del Western Blot de esta técnica se demuestra la presencia de las proteínas del virus VIH-1 las cuales se evidencian con anticuerpos anti-proteínas constituyentes del Virus, en las muestras controladas se demuestra por la aparición de bandas coloreadas específicas (azul-Púrpura) esto debido a que los anticuerpos específicos se fijan en las zonas donde están presentes las proteínas del virus VIH-1, en la tira. Su posición corresponde a los pesos moleculares de las proteínas víricas las cuales se identifican con la posición de las bandas presentes las cuales están colocadas en un orden de mayor a menor peso molecular, estas se observan en la tabla 7.

Tabla 7. Aspecto de las Proteínas del Genoma del VIH-1 en las tiras de Western Blot
---

Denominación	Genoma	Naturaleza	Aspecto en la inmunotransferencia
Gp 160	Env	Glucoproteína precursora de GP 110/120 y GP 41	Bandas con bordes difusos
Gp 110/120	Env	Glicoproteínas de envuelta	Bandas con bordes difusos
P 68/66	Pol	Transcriptasa inversa	Banda clara
P 55	Gag	Precursor de la proteína del núcleo	Doblete
P 52/51	Pol	Transcriptasa inversa	Banda clara
Gp 41	Env	Glucoproteína transmembrana	Banda difusa
P 40	Gag	Precursor de la proteína del núcleo	Banda clara
P 34/31	Pol	Endonucleasa	Banda clara
P 24/25	Gag	Proteína núcleo	Banda clara
P 18/17	Gag	Proteína núcleo	A veces un doblete

## 9. RESULTADOS

### Secuencia Cronológica De Las Pruebas Diagnosticas Voluntario 01-022-10-CAPA

A continuación se presentan las fotografías de las pruebas de Western Blot, en las que se observa la aparición de las bandas proteicas, en base a la diferencia de pesos moleculares

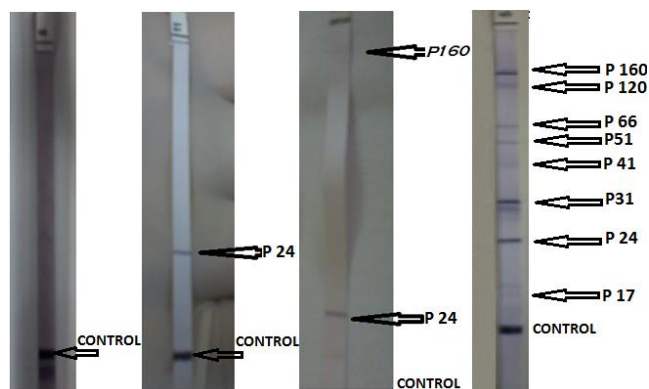


Tabla 8. Secuencia cronológica de las pruebas Diagnósticas del Voluntario 01-022-10-CAPA

Prueba	Tecnica	Resultado Absorbancia	Comentario	Fecha
Presuntiva	ELISA genscreen tm HIV ½ versus 2	2.494 nm v.c. 0.122366	Diagnostico reactivo	27/10/2010
Confirmatoria	western blot new lav blot 1	sin bandas	Diagnostico Negativo	28/10/2010
Presuntiva	ELISA genscreen tm HIV ½ versus 2	2.496 nm v.c. 0.123233	Diagnostico Reactivo	13/01/2011
Confirmatoria	Western Blot new lav blot 1	banda p 24	Diagnostico indeterminado No se encontraron bandas de env.	13/01/2011
Presuntiva	ELISA genscreen tm HIV ½ versus 2	2.549 nm v.c. 0.157033	Diagnostico reactivo	19/04/2011
Confirmatoria	Western Blot new lav blot 1	presentes bandas p 24 y gp160	Diagnostico indeterminado Presentes bandas P 24 y gp160	20/04/2011
Presuntiva	ELISA genscreen tm VIH ½ versus 2	2.537 nm v.c. 0.162333	Diagnostico reactivo	08/06/2011
Confirmatoria	Western Blot new lav blot 1	Bandas presentes p160,p120,p66,p51 p41,p31,p24,p17	Diagnostico Positivo Presentes bandas p160,p120,p66,p51 p41,p31,p24,p17	08/06/2011

En la Figura 13. Se puede observar la comparación del modelo teórico de la evolución indicado por el fabricante del equipo New Lav Blot 1, y los resultados de los estudios realizados al Voluntario 01-022-10 CAPA, se puede observar que en las primeras etapas de infección las presencias de las bandas no coinciden con las que deberían de aparecer según lo estipulado por el fabricante.

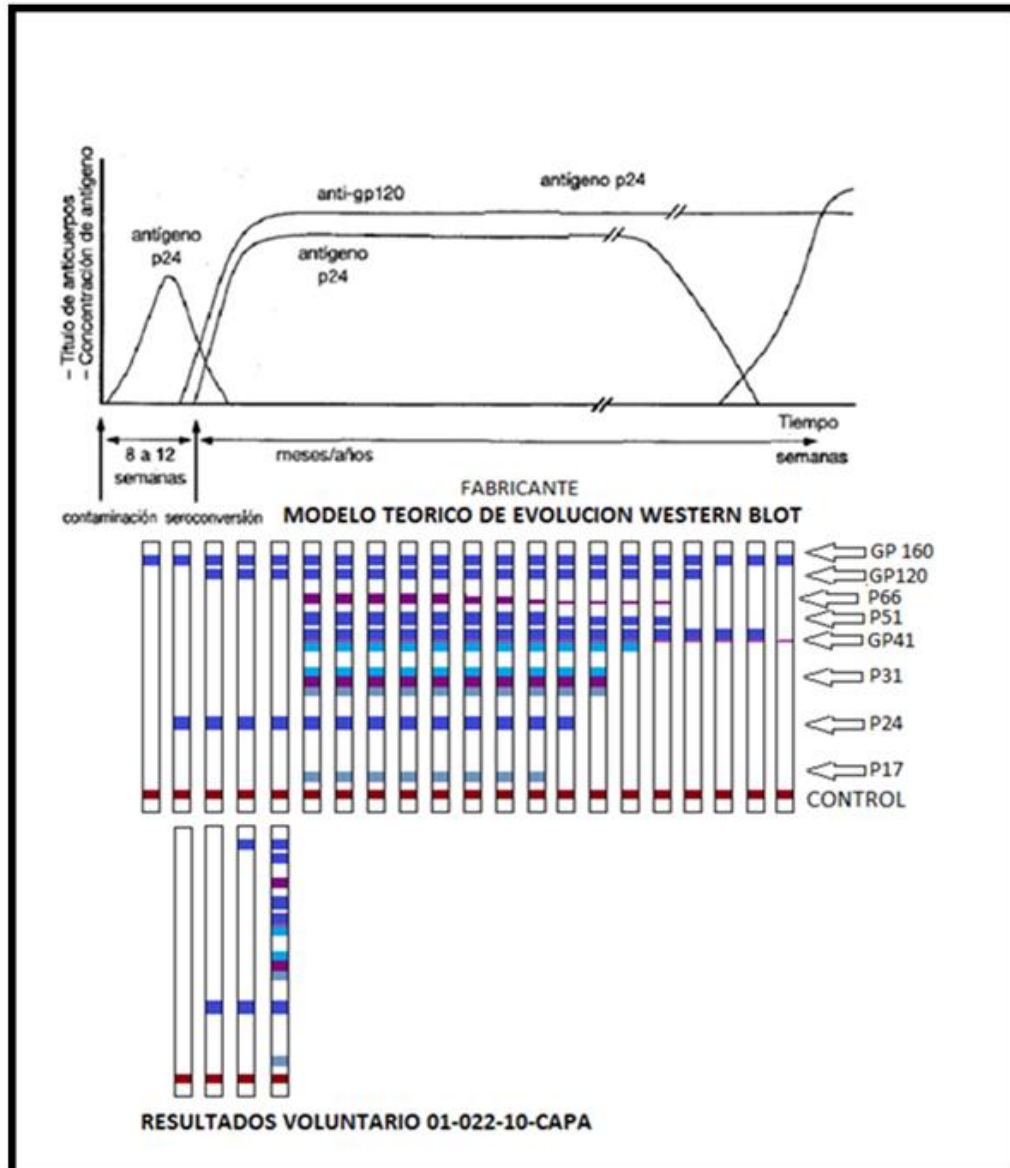


Figura 13. Comparación del Modelo Teórico del Fabricante y los resultados del Voluntario 01-022-10-CAPA.



### Secuencia Cronológica de las Pruebas Diagnósticas Voluntario 01-032-11-CAPA

A continuación se presentan las fotografías de las pruebas de Western Blot, en las que se observa la aparición de las bandas proteicas, en base a la diferencia de pesos moleculares

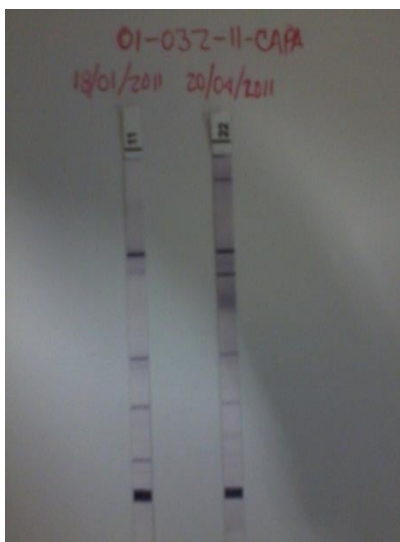


Tabla 9. Secuencia cronológica de las pruebas Diagnósticas del Voluntario 01-032-11-CAPA

Prueba	Tecnica	Resultado Absorbancia	Comentario	Fecha
Presuntiva	ELISA Genscreen Tm HIV ½ Versus 2	2.562nm V.C. 0.1592	Diagnostico Reactivo	14/01/2011
Confirmatoria	Western Blot New Lav Blot 1	Bandas P17,P24,P31,P66,P51	Diagnostico Indeterminado Ausencia De Bandas Gp160, Gp120, Gp41	15/01/2010
Presuntiva	ELISA Genscreen Tm HIV ½ Versus 2	2.567nm V.C. 0.133	Diagnostico Reactivo	19/04/2011
Confirmatoria	Western Blot New Lav Blot 1	Bandas P17,P24,P31,Gp41,P51, P66,Gp120,Gp160	Diagnostico Positivo .	19/04/2011

En la Figura 14. Se puede observar la comparación del modelo teórico de la evolución indicado por el fabricante del equipo New Lav Blot 1, y los resultados de los estudios realizados al Voluntario 01-032-11 CAPA, se puede observar que al igual que en el primer voluntario las presencias de las bandas no aparecen en el orden en el que según lo estipulado por el fabricante debería aparecer.

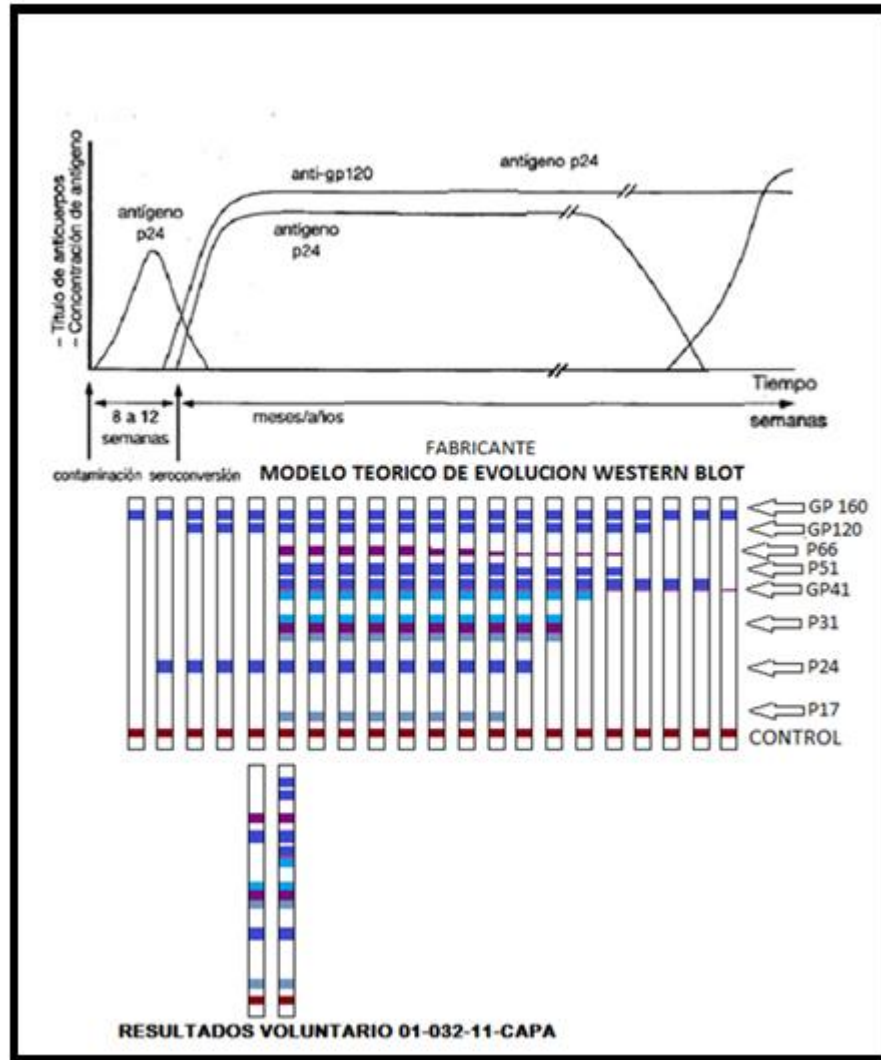


Figura 14. Grafico Lineal 2. . Comparación del Modelo Teórico del Fabricante y los resultados del Voluntario 01-032-11-CAPA

## 10. CONCLUSIONES Y DISCUSIONES

La evaluación de los voluntarios de este estudio, siguió la metodología aprobada en el INDRE, para el diagnóstico de anticuerpos al VIH, que involucra una prueba inicial y una repetición de los sueros reactivos por ELISA seguida de una confirmación por Western Blot. Esta metodología de trabajo resulta altamente sensible y específico. No obstante, la mayoría de pacientes diagnosticados por pruebas de laboratorio ELISA como infectados con VIH, son captados en fases muy avanzadas de la infección, etapas que se prolonga durante años la aparición de bandas proteicas en las cuales ya son detectables los anticuerpos contra este virus, lo que no permite un buen análisis y evaluación en cuanto a pruebas diagnóstico confirmatoria WESTERN BLOT para comprobar la efectividad y precisión en los resultados para detección de VIH con el equipo NEW LAV BLOT 1.

El hallazgo de pacientes que se encuentren en periodo de ventana inmunológica es esencial para hacer una evaluación de la efectividad, calidad y precisión de las pruebas de WESTERN BLOT con el equipo NEW LAV BLOT 1, esto debido a que un paciente que ya se encuentra en un periodo avanzado de la enfermedad presenta siempre las mismas bandas durante periodos de tiempo que abarcan años, lo cual no nos permitiría hacer una evaluación de la precisión del equipo. Es por ello que pacientes que se encuentren en plena etapa de seroconversión son vitales para la evaluación de la precisión del equipo New Lav Blot 1, pues por estar en las primeras etapas de la enfermedad es posible observar como aparecen las bandas proteicas en un periodo corto de tiempo y así confirmar la precisión y calidad del equipo.

El voluntario 01-022-10 CAPA siguió el protocolo de los laboratorios nacionales para el diagnóstico de anticuerpos al VIH, que involucra una prueba inicial y una repetición de los sueros reactivos por ELISA seguida de una confirmación por Western Blot ; en su prueba presuntiva ELISA dio un resultado reactivo y un resultado de prueba confirmatoria WESTERN BLOT utilizando el reactivo de la marca NEW LAV BLOT 1 equipo para la detección de los anticuerpos ANTI-HIV 1 por inmunotransferencia negativo, esto es debido a que el voluntario se encontraba en los primeros días del contagio efectivo del VIH-1 y su sistema inmune reaccionaba con la producción de anticuerpos IgM a la infección, cabe mencionar que los anticuerpos IgM elimina los patógenos en los estadios tempranos de la respuesta inmune mediada por linfocitos B (humoral) hasta que existen suficientes IgGs, esto explica por qué en la primera prueba el ELISA diera reactivo y el WB negativo, porque el kit para prueba presuntiva esta diseñado para identificar anticuerpos IgA, IgM e IgG mientras que el kit para WB de la marca NEW LAV BLOT 1 equipo para la detección de los anticuerpos ANTI-HIV 1 por inmunotransferencia solo detecta anticuerpos IgG.

Durante las siguientes pruebas se obtuvieron resultados reactivos de ELISA pero indeterminadas en WESTERN BLOT pues las bandas encontradas no cumplían con el criterio mínimo de positividad, siendo hasta la cuarta prueba diagnóstica, realizada meses

después de la primera, cuando aparecieran las bandas proteicas necesarias para un diagnostico positivo.

El voluntario 01-032-11-CAPA presento una prueba presuntiva reactiva con un alto valor de lectura con respecto a su valor de corte lo que hacía sospechar que existían una inmensa cantidad de anticuerpos específicos en la sangre del paciente, sin embargo los resultados de WB de la marca NEW LAV BLOT 1 eran Indeterminados, se concluye que el voluntario se encontraba aun en el periodo de ventana y era imposible de determinar un resultado real, sin embargo había transcurrido 3 meses de la fecha de la posible infección según palabras del voluntario a estudio, esto era interesante porque en la mayoría de la población recién infectada por el VIH, la seroconversión es detectada por Western Blot entre 1 a 2 meses posteriores a la primera prueba.

Conforme al protocolo de laboratorios nacionales, y de acuerdo a la NOM-010-SSA2-1993 Norma Oficial Mexicana Para La Prevención Y Control De VIH, se registraría una nueva prueba para corroborar el resultado indeterminado.

Para abrir, meses después de la primera prueba presuntiva reactiva, se realizaría nuevamente el procedimiento de diagnóstico, obteniendo un resultado de ELISA superior al anterior, con un resultado confirmatorio de WB con el equipo NEW LAV BLOT 1 equipo para la detección de los anticuerpos ANTI-HIV 1 por inmunotransferencia de POSITIVO.

Evaluando el tiempo en el que la prueba WESTERN BLOT con el equipo NEW LAV BLOT 1 da el resultado positivo pasando el periodo de ventana inmunológica se notó un periodo mayor al establecido por el fabricante afectado por la aparición de bandas que resulta de manera tardía y no en tiempo y forma mostrado en el modelo teórico de fabricante.

Al distinguir y comparar las proteínas que aparecen en las primeras etapas de la infección con las del modelo teórico entregado por el fabricante, se notaron algunas diferencias, en el caso de la muestra del voluntario 01-022-10 CAPA en la fase en la que el modelo teórico del fabricante marcaba que tenía que aparecer las bandas p24 y GP160 no aparecieron banda alguna en la prueba con muestra real, en la fase en la que el fabricante marcaba la aparición de las bandas p24, GP 120 y GP 160 suficientes para un criterio de positividad mínimo, en la muestra del voluntario apareció la banda 24, en el tercer análisis cuando el fabricante marca en su modelo teórico que deben aparecer nuevamente las bandas p24, GP 120 y GP 160 suficientes para un criterio de positividad mínimo, solo aparecieron la p24 y la GP 160 aún insuficientes para un criterio mínimo de positividad por lo que seguía indeterminado el resultado, finalmente en la 4ª prueba realizada meses después se observa un resultado reactivo, sin embargo las bandas presentes en dicho estudio corresponden a una etapa posterior indicada en el modelo teórico lo que indica la baja precisión que tiene el equipo NEW LAV BLOT 1.

Analizando los criterios mínimos de positividad utilizados en el Laboratorio Estatal de Salud Pública y se distinguió su importancia en los seguimientos a los análisis de los voluntarios, sin embargo tras un seguimiento de los pacientes que pueden salir con pruebas

diagnósticas indeterminadas se puede observar que estos llegan a la seroconversión al aparecer las bandas necesarias en análisis posteriores sin importar el criterio utilizado, a lo cual se debe de hacer énfasis a que todo análisis considerado indeterminado, o con pocas bandas proteicas deben de llevar un seguimiento para conocer más a fondo el comportamiento de la infección.

En conclusión las pruebas diagnóstico confirmatoria WESTERN BLOT con el equipo NEW LAV BLOT 1 muestran su efectividad en el diagnóstico de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana VIH, sin embargo la precisión con la que se realiza es muy baja pues las bandas no llegan a aparecer en el tiempo y forma que indica el fabricante del equipo, sin embargo se requiere de pruebas de laboratorio adicionales.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Alzira, Servicio de Microbiología y Unidad de Investigación en Patología Infecciosa, Hospital de La Ribera Genoma del VIH: estructura, expresión y regulación, Valencia (2005).
2. Artigas. Guía práctica del SIDA, clínica, diagnostic y tratamiento. Bonaventura Clotet Sala 8º edición revisada. (2005).
3. Correa, Identificación de Mujeres Embarazadas Infeccionadas por el VIH-1: Significado de Pruebas Serológicas Indeterminadas (1999)
4. Constantine, Callahan, Watls. Pruebas para la detección del VIH y control de calidad: guía para el personal de laboratorio. AISDSTECH/Family Health International, (1991).
5. Garza. Manual de técnicas de investigación. El Colegio de México. México, DF, México. (1981).
6. Guía metodológica para presentación de informe de residencia, disponible en la dirección:[http://www.itnuevolaredo.edu.mx/takeyas/Apuntes/Seminario\\_Tesis/Apuntes/Metodologia/Residencias.PDF](http://www.itnuevolaredo.edu.mx/takeyas/Apuntes/Seminario_Tesis/Apuntes/Metodologia/Residencias.PDF)
7. Guia Practica Clinica para el manejo del VIH, INDRE. (1998).
8. Hoyos, Falso Negativo en la Prueba de Western Blot en un Paciente con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida,(2007).
9. Hunt, Virología El Virus De La Inmunodeficiencia Humana Y El Sida Cap. 7, Escuela de medicina universidad de Carolina del Sur (2006).
10. Mendieta. Tesis profesionales. Editorial Porrúa, S.A. México, DF, México. (1982).
11. Modificación a la Norma NOM-010-SSA2-1993 Norma Oficial Mexicana Para La Prevención Y Control De VIH
12. NOM-003-SSA-1993 Para La Disposición De Sangre Humana Y Sus Componentes
13. NOM-010-SSA2-1993 Norma Oficial Mexicana Para La Prevención Y Control De VIH
14. NOM-017-SSA2-1998 Para La Vigilancia Epidemiológica
15. NOM-039-SSA2-2002 Para La Prevención Y Control De Enfermedades De Transmisión Sexual
16. NOM-166-SSA1-199 Para La Organización Y Funcionamiento De Los Laboratorios Clínicos
17. NOM-168-SSA1-1998 Del Expediente Clínico
18. Núñez-Forero, Girón-Cepeda, Posible Infección Reciente Por VIH En Pacientes Negativos Por Western Blot, Con Prueba Presuntiva De IV Generación Reactiva Por Antígeno P24(1998)
19. Ochoa, El Análisis Cuantitativo del Inmunoensayo en el Diagnóstico de Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana-1 (2009)
20. Perez, Laboratorios DAVID Blot HTLV-I. Sistema para la detección de anticuerpos al virus linfotrópico de células T tipo I/II (HTLV I/II) en suero o plasma. Instrucciones de uso. 1 ed. La Habana: Laboratorios DAVIH, (1998)

21. Sánchez, Universidad Complutense De Madrid, Variación De Los Genes Accesorios Y Su Implicación En La Biología Del Vih-1, Madrid, España(2009).
22. Sarmiento, Gómez, Castaño Osorio, Evaluación de la respuesta IgG anti-Toxoplasma y su avidéz por WESTERN-BLOT en pacientes infectados por VIH., universidad nacional de Colombia, Bogotá, Colombia universidad del Quindío, armenia, Colombia(2005)
23. Schmelkes. Manual para la presentación de anteproyectos e informes de investigación (tesis). Editorial Harla. México, DF, México. (1988).
24. Viladés, Iñigo, Factores Genéticos Del Huésped, Riesgo De Infección Y De Progresión De La Infección Por El Virus de La Inmunodeficiencia Humana (VIH) LabordalISBN:978-84-692-9055-2/DL: T-2059-2009
25. Tenorio. Técnicas de investigación documental. Tercera edición. Editorial McGraw Hill. Atizapán de Zaragoza, Estado de México, México. (1992).

## **ANEXOS**

### **Normas Utilizadas Para El Estudio**

NOM-003-SSA-1993 PARA LA DISPOSICION DE SANGRE HUMANA Y SUS COMPONENTES

NOM-010-SSA2-1993 NORMA OFICIAL MEXICANA PARA LA PREVENCION Y CONTROL DE VIH

NOM-017-SSA2-1998 PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA

NOM-039-SSA2-2002 PARA LA PREVENCION Y CONTROL DE ENFERMEDADES DE TRANSMISION SEXUAL

NOM-087-ECOL-SSA1-2001 PROTECCION AMBIENTAL-SALUD AMBIENTAL RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO INFECCIOSOS

NOM-166-SSA1-199 PARA LA ORGANIZACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS CLINICOS

NOM-168-SSA1-1998 DEL EXPEDIENTE CLINICO





Imagen de la prueba rápida, a la izquierda el cartucho del voluntario 01-022-10-CAPA y a la derecha el cartucho del voluntario 01-032-11-CAPA.

Como se puede ver en la imagen ambos voluntarios resultaron con Prueba Rápida REACTIVA por lo que serán evaluados ahora con el Equipo para detección de anticuerpos anti VIH1 y VIH 2 GENSCREEN TM HIV 1/2 versus 2

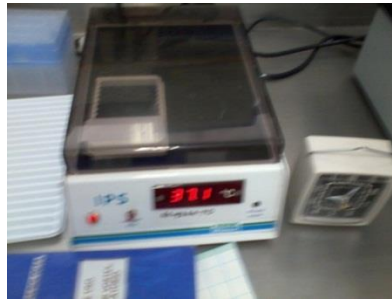
**Realización De La Prueba E.L.I.S.A.**  
**Prueba De Tamizaje**  
**Genscreen Tm Hiv 1/2 Versus 2**  
**Para La Detección De Anticuerpos Anti Vih-1 Y Anti Vih-2 En El Suero/ Plasma Mediante Técnica**  
**Inmunoenzimatica**



KIT DE TRABAJO



CONTROLES USADOS EN LA PRUEBA

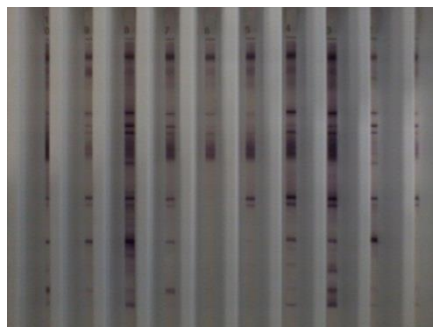
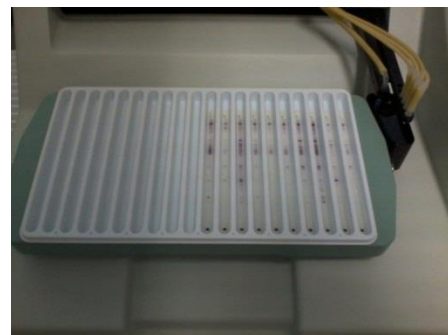
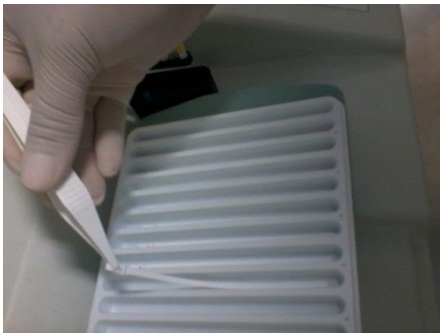


	1	2	3	4	5
A	0.012 NC1	0.023 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG
B	0.928 CO1	0.027 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG
C	0.927 CO2	0.015 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG
D	0.918 CO3	2.494 POS	0.000 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG
E	2.289 PC1	2.502 POS	0.000 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG
F	2.494 PO2	2.489 POS	0.000 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG
G	0.002 NEG	2.513 POS	0.000 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG
H	0.012 NEG	0.003 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG	0.000 NEG

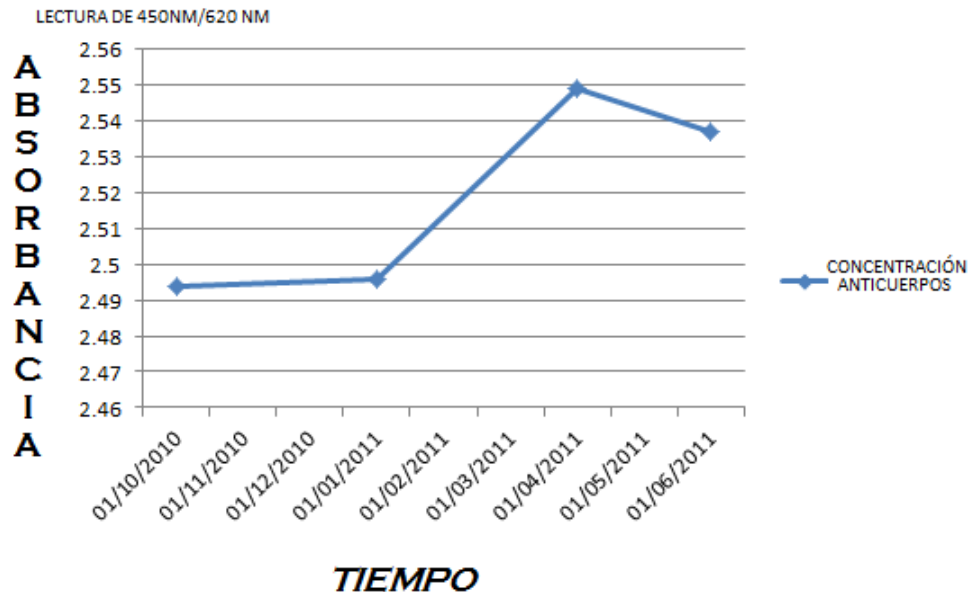
**Realización De La Prueba De Western Blot**  
**Confirmatoria**  
**New Lav Blot 1**  
**Equipo De Confirmación Para La Detección De Anticuerpos Anti-Vhi-1 En Suero/Plasma Mediante**  
**Inmunotransferencia**



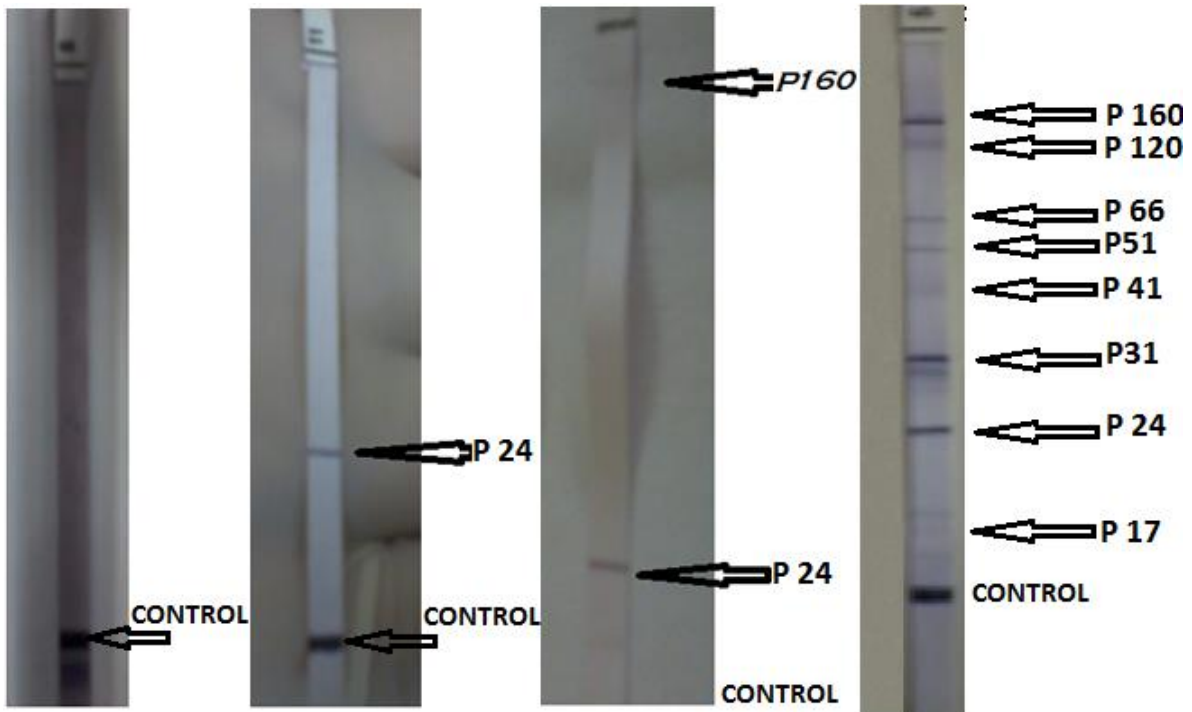
KIT DE NEW LAV BLOT 1



## ***EVOLUCIÓN DEL PACIENTE EN RELACIÓN DE ANTICUERPOS***



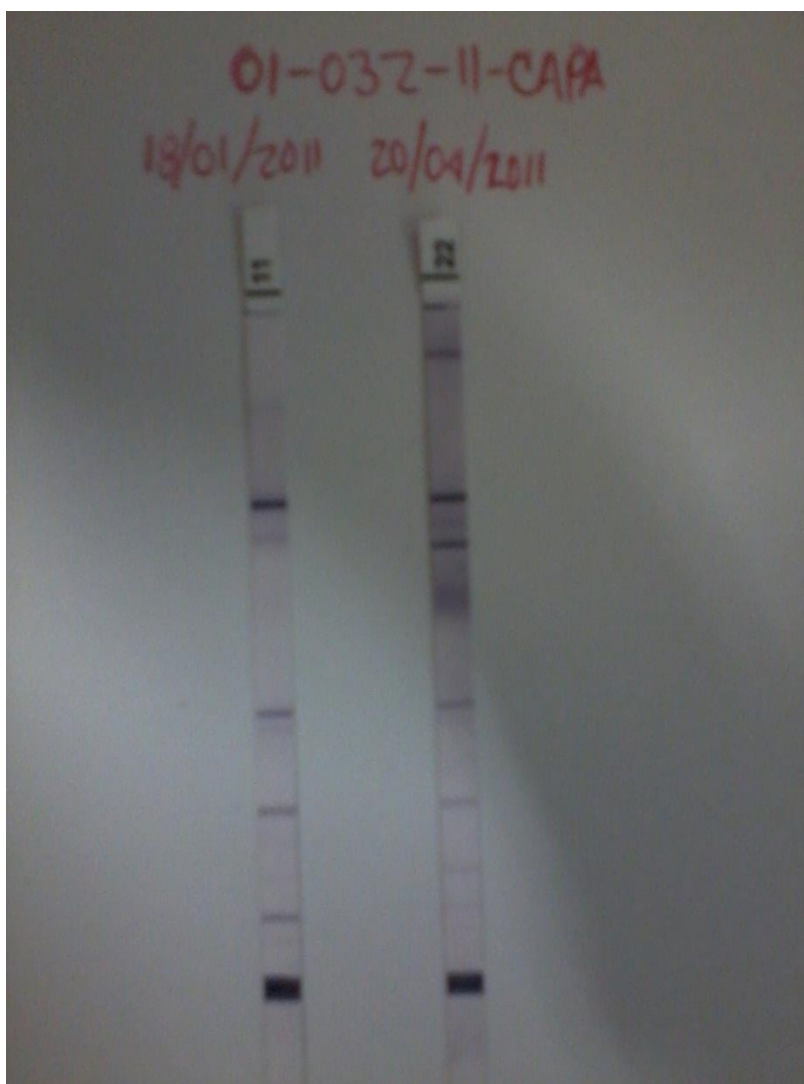
En la presente grafica se muestra la progresión del voluntario 01-022-10-CAPA en una relación de la absorbancia en concentración de anticuerpos y el tiempo transcurrido. Este tipo de prueba diagnóstica es muy sensible, y detectar anticuerpos IgM e IgG. Cabe mencionar que a diferencia de las pruebas de Western Blot, el diagnóstico de tamizaje detecta anticuerpos gM e IgG y la prueba confirmatoria solo detecta anticuerpos IgG, esto debido a que los primeros anticuerpos que se encuentran en el cuerpo son IgM los cuales son los primeros marcadores serológicos, el anticuerpo IgG se presentan posteriormente, lo cual puede provocar que una prueba inmunoenzimatica como es el ELISA resulte reactiva, y una prueba confirmatoria resulte indeterminada en los primeras etapas de la seroconversión.

Western Blot

Clave del Paciente 1: 01-022-10-CAPA

Fechas de realización de la prueba: 28/10/2010, 13/01/2011, 20/04/2011, 08/06/2011

CLAVE INTERNA	FECHA DE REALIZACION	BANDAS ENCONTRADAS	DIAGNOSTICO
<i>Estudio Western Blot</i>	<i>Estudio Western Blot</i>	<i>Estudio Western Blot</i>	<i>Estudio Western Blot</i>
DE-022281	28/10/2010	SIN BANDAS	NEGATIVO
DE-00250	13/01/2011	P24	INDETERMINADO
DE-08369	20/04/2011	P24,P160	INDETERMINADO
DE-13535	08/06/2011	P160,P120,P66,P51, P41,P31,P24,P17	POSITIVO

Western Blot

Clave del Paciente 1: 01-032-11-CAPA

CLAVE INTERNA	FECHA DE REALIZACION	BANDAS ENCONTRADAS	DIAGNOSTICO
<i>Estudio Western Blot</i> DE-022281	<i>Estudio Western Blot</i> 14/01/2011	<i>Estudio Western Blot</i> P17,P24,P31,P66,P51	<i>Estudio Western Blot</i> INDETERMINADO
DE-00250	19/04/2011	P17,P24,P31,GP41,P51, P66,GP120,GP160	POSITIVO

## **Genscreen Tm Hiv ½ Version 2**

Prueba De Tamizaje

Genscreen Tm HIV ½ versus 2

1 placa – 96 tests

Para La Detección De Anticuerpos Anti Vih-1 Y Anti Vih-2 En El Suero/ Plasma Mediante Técnica Inmunoenzimatica

### **Control De Calidad Del Fabricante**

Todos los productos fabricados y comercializados por la sociedad Bio-Rad se someten a un sistema de calidad, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización de los productos terminados.

Cada lote de producto terminado es objeto de un control de calidad y únicamente se comercializa si esta conforme a los criterios de aceptación.

La documentación relativa a la producción y al control de cada lote se conserva archivada.

### **1. Interés Clínico**

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad infecciosa de origen vírico que se traduce en un déficit profundo de la inmunidad celular.

Se han aislado dos tipos de virus, emparejados con el grupo de los lentivirus, a partir de los linfocitos de pacientes afectados de SIDA o de sus pródromos.

El primero llamado VIH 1, fue aislado en Francia y posteriormente en Estados Unidos.

El segundo llamado VIH 2, fue aislado en 2 enfermos de origen africano y resulto ser el responsable de un nuevo foco de SIDA en el oeste de Africa.

Los conocimientos sobre la variabilidad genética de las cepas de VIH se adquirieron mediante la secuenciación de los genes GAG, POL Y ENV de las cepas representativas de cada uno de los subtipos. Los virus VIH 1 se dividen en 2 grupos: e grupo M (que incluyen 9 subtipos (del A al I) y el grupo O. el virus VIH 2 incluye 5 subtipos.)

Actualmente la distribución geográfica de de los diferentes subtipos están bastante bien definida. Algunas variantes del VIH 1 solo tienen un 70% de homología para los genes

GAG y POL con los principales marcadores y únicamente un 50% para el gen ENV, estas diferencias pueden explicar los fracasos en el diagnóstico de la infección para algunos pacientes.

Las distintas cepas del virus VIH-2 presentan aspectos antígenos comunes con el virus simio SIV en todas las proteínas (proteínas de envoltura y proteínas internas: heterología: 30%). Pero presentan menos del 40% de homología con las proteínas de la envoltura del virus VIH-1.

El test GENSCREEN HIV1/2 versión 2 permite la detección simultánea de los anticuerpos anti VIH-1 y anti VIH-2.

## 2. Fundamentos Del Genscreen TM HIV-1/2 Versión 2

Genscreen TM HIV-1/2 Versión 2 es una técnica inmunoenzimática basada en el principio del sándwich en dos etapas, para la detección de los diferentes anticuerpos asociados a los virus VIH-1 y VIH-2 en el suero o el plasma humano.

Genscreen TM HIV-1/2 Versión 2 se basa en la utilización de una base sólida elaborada con antígenos purificados (proteínas recombinantes gp 160 y p25 del virus VIH-1 y péptido mimético del epitopo inmunodominante de la glucoproteína de la envoltura del virus VIH2) y de un conjugado preparado con antígenos marcados con peroxidasa (proteína recombinante nucleocapsídica y péptidos miméticos de los epitopos inmunodominantes de las glucoproteínas de la envoltura de los virus VIH-1 y VIH-2).

### La realización del test incluye las siguientes etapas

- Los sueros a estudiar y los sueros de control se distribuyen en los pocillos. Si existen anticuerpos VIH-1 o VIH-2, estos se unen a los antígenos fijados sobre la fase sólida. La presencia de la muestra se valida mediante un cambio de color del violeta al azul (SDP= Sample deposition proof)
- Tras el lavado, se añaden los antígenos VIH-1 y VIH-2 purificados y marcados con peroxidasa. A su vez, estos se unen a las IgG o IgM o IgA, fijadas por la fase sólida.
- La presencia de enzimas inmovilizadas sobre los complejos se revelan mediante incubación en presencia del sustrato, tras la eliminación de la fracción de conjugados que permanece libre.
- Una vez interrumpida la reacción, la lectura se efectúa mediante espectrofotómetro 450/620-700 nm. La absorbancia observada en una muestra permite establecer la presencia o ausencia de anticuerpos anti VIH-1 o VIH-2.

## 3. COMPOSICION DEL KIT Genscreen TM HIV-1/2 Version 2

Todos los reactivos están destinados para su uso exclusivo en el diagnóstico in vitro.



#### 4. Validez – Conservación

El kit debe conservarse a +2 -8 °C. todos los elementos de estuche Genscreen TM HIV-1/2 Version 2 conservados a +2 – 8 °C. pueden ser utilizados hasta la fecha de caducidad indicada en el Kit, salvo indicación específica:

R1: una vez abierta la bolsa sellada al vacio, las tiras de micropocillos almacenadas a +2 -8 °C. en la bolsa cuidadosamente sellada se pueden usar durante 1 mes.

R2: la solución de lavado diluida se puede conservar a temperatura ambiente (2-30°C) durante 2 semanas. La solución de lavado concentrado (R2) se puede conservar a +2 -8 °C.

R7a + R7b : los reactivos almacenados a +2 -8 °C. se pueden usar durante 4 semanas después de la reconstitución de los viales.

R8 + R9 : después de su reconstitución, el reactivo almacenado en la oscuridad se puede usar durante 5 horas a temperatura ambiente (18-30°C).

#### 6. Muestras

Extraer muestra de sangre según las practicas habituales

Los tests se realizan con muestras no diluidas de suero o plasma, recogidas con anticoagulantes como el EDTA.

Extraer el suero o plasma del coagulo o los globulos rojos lo antes posible para evitar la hemolisis. Una hemolisis muy pronunciada puede afectar la capacidad diagnostica del test. Las muestras presentes agregadas deben ser clasificadas mediante centrifugación antes del test. Las partículas o agregados de fibrina en suspensión pueden dar resultado falsamente positivo.

No calentar las muestras.

Las muestras se conservaran a +2 -8 °C. si la detección se realiza en los 7 dias siguientes, también pueden conservarse congeladas a -20°C. el plasma deberá someterse a una descongelación rápida con calefacción durante varios minutos a 40°C (para limitar la precipitación de las fibrinas).

Evitar las congelaciones o descongelaciones repetidas.

La muestra que haya sido congelada y descongelada mas de 3 veces no debe ser utilizada.

Si las muestras tienen que viajar, se embalarán según la reglamentación habitual para el transporte de agentes etiológicos.

No Deben Usarse Sueros O Plasmas Contaminados, Hiper-Lipemicos O Hemolizados

## 7. Precauciones.

La calidad de los resultados depende del cumplimiento de las buenas practicas de laboratorio siguientes:

- El nombre del test, así como su número de identificación específico se indican en la caja de cada micro placa. Este número de identificación, específico figura igualmente en cada tira.

Esta identificación se tiene que verificar antes de cada uso. Las tiras que no tengan el número de test o que sea diferente al test realizado, no se deben utilizar.

- No utilizar reactivos después de su fecha de caducidad.
- No mezclar en un mismo ensayo reactivo que procedan de lotes diferentes.
- La solución de revelado (tapón sustrato + cromógeno) debe estar coloreada en rosa. La aparición de otra coloración en los minutos siguientes a la reconstitución indica que el reactivo es inutilizable y se debe sustituir. Para esta preparación, utilizar preferentemente recipientes y material de distribución de plástico de uso único o una cristalería previamente lavada con HCL 1N y perfectamente aclarada con agua destilada y secada. Conservar esta preparación protegida de la luz.
- Antes de utilizarlo esperar 10 minutos para que los reactivos alcancen la temperatura del laboratorio.
- Reconstituir cuidadosamente los reactivos.
- Verificar la exactitud y la precisión de las pipetas y el correcto funcionamiento de los aparatos utilizados
- No modificar el procedimiento de utilización.
- Lavado: es imprescindible respetar escrupulosamente los procedimientos de lavado para lograr la máxima capacidad diagnóstica del test.

## Consignas de higiene y seguridad

Los controles positivos y umbral han sido inactivados mediante calor.

El material de origen humano utilizado en la preparación del control negativo ha sido sometido a test, determinándose ausencia de anticuerpos anti VIH-1 y anti VIH-2, antígeno HBs y anticuerpos VHC.

El material de origen humano utilizado para preparar el control positivo y el suero umbral a sido sometido a test. Determinándose la ausencia de antígeno HBs y anticuerpos VHC.

Puesto que ningún método puede garantizar la ausencia absoluta de virus de VIH, Hepatitis B o C u otro agente infeccioso, estos reactivos, así como las muestras tomadas de pacientes, deben consignarse como potencialmente infecciosos y deben manipularse con las precauciones habituales.

El material en contacto directo con las muestras o reactivos, así como las soluciones de lavados, deben considerarse como productos contaminados.

El autoclavado a 121°C durante mínimo una hora es el mejor procedimiento de inactivación de los virus de VIH y Hepatitis B.

También se pueden tratar las soluciones y el material contaminado con lejía a una concentración de 5% de hipoclorito de sodio durante 30 min. Para la inactivación de los virus VIH y del virus de la Hepatitis B. Evítese el contacto del tapón sustrato, del cromógeno y de la solución de interrupción con la piel y las mucosas.

Asimismo la manipulación y la eliminación de los productos químicos deben de efectuarse según las buenas prácticas de laboratorio.

Algunos reactivos contienen azida de sodio como conservador. La azida de sodio puede formar azida de plomo o de cobre en las tuberías del laboratorio estas azidas son explosivas. Cuando las soluciones que contengan azida se eliminen por el fregadero tras su inactivación, deben aclararse las tuberías con abundante agua para evitar su acumulación.

## Información Para Su Salud Y Seguridad

- Algunos de los componentes del kit contienen derivados de sangre humana. No existe una prueba diagnóstica conocida que podría brindar la total certeza que productos derivados de la sangre humana no podrían transmitir agentes infecciosos. En consecuencia todos los derivados de sangre humana deben considerarse potencialmente infecciosos. Se recomienda que el manejo de estos reactivos y de especímenes humanos se efectúe aplicando las reglas establecidas en lo que es la buena práctica a nivel del laboratorio clínico.

- Deben usarse guantes desechables, batas de laboratorio y gafas protectoras mientras se efectúa cualquier manipuleo con los reactivos y las muestras. Las manos deben lavarse cuidadosamente después del trabajo.
- El conjugado, buffer concentrado de lavado y los controles positivos y negativos contienen ProClin™ 300. Debe evitarse el contacto con la piel y con los ojos.
- No se debe comer, tomar o fumar en el área donde se trabaja con los reactivos y los especímenes. Evite también de pipetear con la boca.
- Evite cualquier contacto con el Substrato A, Substrato B y la Solución de Parada, tanto en la piel o la mucosa. La Solución de Parada contiene Ácido Sulfúrico 2M que es fuertemente ácido. Si resultara un derrame limpie el área inmediatamente usando gran cantidad de agua. y proceda en la misma forma cuando el ácido entrara en contacto con la piel o el ojo y busque la atención médica.
- Los aparatos que no sean descartables deben ser esterilizados después de usarse. El método preferido

De esterilización es por autoclave durante una hora a 121°C. Los descartables deben ser autoclavados o incinerados. No auto clave materiales que contengan hipoclorito de sodio.

- Manipule y descarte todas las muestras y materiales empleados para realizar el examen como si fueran agentes infecciosos. Observe y establezca precauciones contra riesgos microbiológicos durante todo el procedimiento y siga los procedimientos estándar para desechar apropiadamente las muestras.
- Observe buenas prácticas de laboratorio cuando manipule químicos y material potencialmente

Infeccioso. Descarte todo el material contaminante, muestras y reactivos de origen humano, después de una apropiada descontaminación y siguiendo las regulaciones locales, estatales y federales.

- Los ácidos neutralizados y otros líquidos deben ser descontaminados añadiendo suficiente volumen de hipoclorito de sodio para obtener una concentración final de al menos 1,0%. Una exposición de 30 minutos de hipoclorito de sodio al 1% puede ser necesaria para lograr una efectiva descontaminación.

### Almacenamiento Y Estabilidad

- El estuche de pruebas debe almacenarse a 2-8°C. Todos los reactivos son estables hasta la fecha de vencimiento impresa en la caja. Previo uso todos los reactivos y componentes deben alcanzar temperatura ambiente. Después de usar los reactivos estos deben devolverse inmediatamente a la refrigeradora.
- Las micro placas vienen dentro de un sobre sellado de aluminio con un secante. Previo uso de la micro placa o de tiras individuales de micro pozos permita que el sobre de aluminio sellado alcance Temperatura ambiente, en su defecto al abrir el sobre agua quedaría condensada en la micro placa.
- Una vez abierto el sobre de aluminio las tiras de micro pozos pueden usarse dentro de un (1) mes. Tiras no Usadas deben guardarse a 2-8°C en el sobre de aluminio original con su secante y bien sellado.
- El Buffer de Lavado Concentrado puede almacenarse a temperatura de ambiente evitándose así la Cristalización. En caso de que se mostrara precipitación de cristales previo uso la solución debe

Calentarse a 37°C hasta que los cristales desaparezcan. Una vez diluido la Solución de Trabajo del

Buffer de Lavado está estable durante 2 semanas a temperatura de ambiente.

- No exponga los reactivos y específicamente el Substrato a luz intensa o a aerosoles de hipo cloruro Durante las incubaciones.

### Recolección De La Muestra Y Preparación

- La prueba ELISA de VIH 1/2/O Anticuerpos solo puede efectuarse con suero o plasma humano

Después de una venipuncion de sangre completa.

- Pueden usarse los tubos de recolección con EDTA, heparina sódica y ACD para efectos de recolectar muestras de sangre completa o plasma por medio de una ven punción. El preservante acido de sodio causa resultados erróneos ya que desactiva a la peroxidasa de rábano.
- Separe el suero o el plasma de los eritrocitos lo mas rápido posible para evitar hemólisis. No use

especímenes significativamente hemolíticos, lipídicos o turbios. Especímenes con material particular deben centrifugarse previo usos. No use especímenes con partículas de fibrina o contaminados por crecimiento de microbios.

- No deje los especímenes a temperatura de ambiente por tiempo prolongado. Tanto sueros como

plasma pueden almacenarse a 2-8°C hasta por 7 días previo ensayo. Si fuera necesario de almacenar los especímenes por mas tiempo manténgalos congelados por debajo de -20°C.

- Las muestras deben encontrarse a temperatura ambiente antes del examen. Las muestras congeladas deben descongelarse completamente y mezclarse bien antes del examen. Las muestras no deben ser congeladas y descongeladas repetidamente.
- Si las muestras deben ser transportadas, deben empacarse de acuerdo con las regulaciones locales que cubren el transporte de agentes etiológicos.

### **Material necesario pero no proporcionado**

- Agua recientemente destilada o desionizada
- Solución de sodio hipo cloruro para descontaminación
- Papel absorbente
- Baño de María o incubador para mantener 37°C
- ± 2° C
- Lavador calibrado de ELISA automático o manual de placas o de tiras para aspirar y dispensar 350 µL / micro pozo
- Guantes desechables
- Micro pipetas calibradas con punta desechable para dispensar 50 y 100 µL
- Cilindro graduado para Solución diluida de buffer de lavado
- Vortex (opcional)
- Cronometro
- Contenedores desechables de reactivo
- Lector de micro placas calibrado para medir absorbancia a 450 nm con un filtro de referencia de 630-700 nm o sin filtro de referencia a 450 nm
- Procesador automático (opcional)

### Instrucciones De Uso

Tanto los reactivos como los especímenes deben haber alcanzado la temperatura (15-30°C) de ambiente previo ensayo. Apéguese estrictamente a las instrucciones de trabajo. El ensayo debe concluirse dentro de los límites de tiempo previstos. Al micro pozo A1 se asigna el blanco. A partir del micro pozo A2 coloque los controles en orden vertical u horizontal. El procedimiento que sigue asigna micro pozos específicos en orden vertical pero puede variar en función del software.

<b>PASO</b>	<b>PROCEDIMIENTO DETALLADO</b>	<b>PROCEDIMIENTO SIMPLE</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prepare la Solución de Trabajo del Buffer de Lavado diluyendo el Buffer de Lavado Concentrado 1:25. Vierta el contenido del frasco en un cilindro graduado y rellénelo con agua destilada o deionizada hasta la marca de 1250 mL. Esta Solución de Trabajo es estable por 2 semanas a 15-30°C.</li> <li>Nota: Si se muestra que el Buffer de Lavado Concentrado contiene cristales se debe calentarlo a 37° C hasta todos los cristales se disuelvan.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prepare la Solución de Trabajo del Buffer de Lavado diluyendo el Buffer de Lavado Concentrado 1:20</li> </ul>
<b>1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agregue 75 µL del Control Negativo a micro pozos A1</li> <li>Agregue 75 µL de Control Umbral en pozos B1,C1,D1.</li> <li>• Agregue 75 µL del Control VIH-1 Positivo a micro pozos E1.</li> <li>• Agregue 75 µL de cada muestra a partir del micro pozo F1.</li> <li>• Remueva las tiras de micro pozos sin usar de la placa y guárdelas selladas en el sobre de aluminio original a 2-8° C.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A1: Agregue 75 µL del Control Negativo</li> <li>• B1,C1,D1: Agregue 75 µL del Control VIH-1 Umbral</li> <li>• E1: Agregue 75 µL del Control VIH-2 Positivo</li> <li>•Empezando con F1: Agregue 75 µL del espécimen</li> <li>•Remueva y guarde tiras de micro pozos sin usar a 2-8°C</li> </ul>
<b>2</b>	<p>Mezcle suavemente la placa sobre una superficie plana por durante 30 segundos.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cubra la placa con el sellador plástico y proceda de incubarla en un baño de Maria o una incubadora a 37°C ± 2°C por 30 minutos ± 2 minutos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Mezcle suavemente</li> <li>•Cubra la placa con el Sellador plástico e incúbela a 37°C por 30 minutos</li> </ul>
<b>3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remueva el sellador plástico.</li> <li>• Lave cada micro pozo 5 veces con 350 µL de la Solución de Trabajo del Buffer de Lavado y remueva el líquido en seguida.</li> <li>• Voltee la placa y colóquela sobre un papel absorbente durante varios segundos. Cerciórese que todos los micro pozos queden totalmente secos.</li> <li>Nota: Un lavado insuficiente puede causar resultados falsos positivos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Remueva el Sellador plástico</li> <li>• Lave cada micro pozo 5 veces con 350 µL de la Solución de Trabajo del Buffer de Lavado</li> <li>• Voltee la placa y colóquela sobre papel absorbente</li> </ul>

<b>4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agregue 100 <math>\mu</math>L del Conjugado a cada micro pozo excepto al Blanco. El color del Conjugado es rojo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Agregue 100 <math>\mu</math>L del Conjugado a cada micro pozo excepto al blanco</li> </ul>
<b>5</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cubra la placa con el sellador plástico e incúbela en un baño de Maria o incubadora a <math>37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}</math> por 20 minutos <math>\pm</math> 2 minutos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Cubra la placa con el Sellador plástico e incúbela a <math>37^{\circ}\text{C}</math> por 20 minutos</li> </ul>
<b>6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Repita paso 3.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Repita paso 3.</li> </ul>
<b>7</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agregue 50 <math>\mu</math>L del Substrato A a cada micro pozo. (Reactivo Claro)</li> <li>• Después agregue 50 <math>\mu</math>L del Substrato B a cada micro pozo. (Reactivo Claro) Luego un color azul debe desarrollarse en las celdas que contengan muestras positivas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Agregue 50 <math>\mu</math>L del Substrato A a cada micro pozo</li> <li>• Después agregue 50 <math>\mu</math>L del Substrato B a cada micro pozo</li> </ul>
<b>8</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mezcle suavemente luego cubra la placa micro celdas con el Sellador de Placas e incube en un baño de Maria o incubadora a <math>37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}</math> por 10 minutos <math>\pm</math> 1 minuto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Mezcle, luego cubra la placa de micro celdas con el Sellador de Placas e incube a <math>37^{\circ}\text{C}</math> por 10 minutos</li> </ul>
<b>9</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remueva el sellador plástico.</li> <li>• Agregue 50 <math>\mu</math>L de la Solución de Parada a cada un micro pozo para detener la reacción de color. (Reactivo Claro)</li> </ul> <p>Luego un color amarillo debe desarrollarse en las celdas que contengan muestras positivas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Remueva el sellador plástico</li> <li>•Agregue 50 <math>\mu</math>L de la Solución de Parada a cada micro pozo</li> </ul>
<b>10</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lee la absorbancia en 450/630 nm dentro de los 30 minutos.</li> </ul> <p>Nota: El plato micro celdas también puede leerse a 450 nm, pero se recomienda que se lea a 450/630 nm para mejores resultados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lee la absorbancia en 450/630 nm dentro de los 30 minutos</li> </ul>



1. Calcule el promedio de la absorbancia por medio de los controles umbrales (C.U.) CUT OFF, refiriéndose a la tabla.

Ejemplo de Cálculo del Valor de Corte (V.C.)

Ítem	Absorbancia
Control Negativo: Micro pozo B1	C.N.
Control Umbral 1	C.U. 1
Control Umbral 2	C.U. 2
Control Umbral 3	C.U. 3
Control Positivo	C.P.
Promediar el Control Umbral	$CU = (CU1 + CU2 + CU3 / 3)$
Valor de corte (el promedio del C.U. dividido en 10)	$V.C. = (CU / 10)$

Requerimientos De Validación Para Determinar Si Los Resultados Son Validos.

CONTROLES DE LA PRUEBA	ABSORBANCIA EN MARGEN DE ESPECTROFOTOMETRICO DE 450nm a 620nm
CONTROL NEGATIVO	La absorbancia debe ser menor a 0.500 nm
CONTROL UMBRAL	La absorbancia debe ser mayor a 1 nm y menor a 2 mn
CONTROL POSITIVO	La absorbancia debe ser mayor a 2 nm

NOTA: Los resultados deben ser clasificados como inválidos si no se cumplen los requisitos anteriores de validación. Repita los ensayos o contacte su distribuidor local.

### Interpretación de Resultados.

**NO REACTIVO:** Especímenes con absorbancias por debajo del valor Cut-Off se consideran no reactivos para los anticuerpos VIH-1, VIH-2 y / o subtipo O pueden reportarse como negativos.

**REACTIVO:\*** Especímenes con absorbancias iguales o mayores que el valor Cut-Off se consideran

reactivos para los anticuerpos VIH-1, VIH-2 y / o subtipo O y deben recorrerse en duplicado previo

reporte final. Especímenes que resultan reactivos en por lo menos uno de los ensayos en duplicado se consideran presumiblemente reactivos y deben confirmarse por otras pruebas confirmativas. Especímenes que resultan no reactivos en ambos ensayos del ensayo duplicado se consideran no reactivos.

\*NOTA: Especímenes con valores dentro de  $\pm 10\%$  del valor Cut-Off deben reexaminarse en duplicado para su interpretación final.

### Limitaciones Del Test.

1. La prueba GENSCREEN TM HIV ½ versus 2 Anticuerpos es usada para la detección de anticuerpos contra VIH-1,

VIH-2 y / o subtipo O en suero o plasma humano. El diagnóstico de una enfermedad contagiosa no

debe ser establecida basándose solamente en el resultado de una sola prueba. Exámenes posteriores, incluyendo exámenes confirmatorios, deben realizarse antes que una muestra sea considerada positiva.

Un examen no-reactivo no excluye la posibilidad de exposición. Muestras conteniendo precipitados pueden dar resultados inconsistentes.

2. Como con todas las pruebas diagnósticas cada resultado debe interpretarse en el contexto de otra información clínica disponible al médico.

3. Se sabe que en inmunoensayos sensibles siempre existe la posibilidad de una reacción positiva no reproducible por un lavado inadecuado. También puede verse afectado el resultado por errores

### Procedales o error del instrumento.

4. Los Controles de la prueba no pueden ser usados para la cuantificación de la sensibilidad de la prueba ELISA VIH 1/2 Anticuerpos sino sirven exclusivamente para verificar que los componentes del kit son capaces de detectar un espécimen reactivo siempre y cuando que el procedimiento de la prueba se ejecuta acorde a las instrucciones y que se cumplen las condiciones de almacenamiento.

## **Características Del Desempeño**

### Sensibilidad y especificidad

La prueba del test GENSCREEN HIV1/2 Anticuerpos identifico correctamente a los especímenes de un panel de

Seroconversión y fue comparada con una prueba VIH ELISA comercial líder en el mercado usando

Especímenes clínicos. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica de la prueba test GENSCREEN HIV1/2 O Anticuerpos es >99,9% y la especificada clínica es 99,8%.

### **HIV 1/2/O Anticuerpos EIA vs. Otro EIA**

Método	Resultados	Otros EIA		Resultado Total
		Positivo	Negativo	
HIV 1/2/O Anticuerpos EIA	Positivo	74	2	76
	Negativo	0	1.043	1.043
Resultados Totales		74	1.045	1.119

Sensibilidad Clínica: >99,9% (95,1-100,0%)\*  
Coincidencia Total: 99,8% (99,4-100,0%)\*

Especificidad Clínica: 99,8% (99,3-100,0%)\*  
\*95% Intervalo de Confidencia

## Prueba De Confirmación

Las pruebas diagnósticas de WESTERN BLOT que se realizan en el Laboratorio Estatal de Salud Pública son realizadas en el área de Serología Epidemiológica con el equipo "NEW LAV BLOT 1 Equipo de confirmación para la detección de anticuerpos ANTI-VIH-1 en suero/plasma mediante inmunotransferencia"

A continuación se presenta las características del equipo

### **NEW LAV BLOT 1**

Equipo de confirmación para la detección de anticuerpos ANTI-VIH-1 en suero/plasma mediante inmunotransferencia

#### Uso Previsto

el equipo NEW LAV BLOT 1 está diseñado para la detección de anticuerpos humanos anti-VIH-1 en el suero o en el plasma mediante inmunotransferencia para confirmar una respuesta positiva anti-VIH-1 y determinar su especificidad antigénica dentro del ámbito del diagnóstico del SIDA.

#### Valor Clínico

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fue identificado como enfermedad bien caracterizada en 1981. Se aislaron tres retrovirus (LAV, HTLV III, ARV), relacionados con el grupo de los lentivirus y no diferenciados mediante las pruebas serológicas convencionales, a partir de los linfocitos de pacientes con SIDA o con propomos del SIDA. La decisión de agrupar estos tres virus con la misma denominación (VIH) se tomó en 1986.

La transmisión vírica se produce fundamentalmente por vía sexual o sanguínea. Las autoridades sanitarias tomaron diversas medidas para limitar la diseminación del Virus; se hicieron necesarios los controles de las donaciones de sangre para eliminar muestras potencialmente infecciosas.

El cribado se basa en la detección de anticuerpos en el suero o el plasma usando la técnica de inmunovaloración enzimática.

La calidad de los antígenos empleados en estas pruebas no permite eliminar algunas respuestas inespecíficas. Teniendo en cuenta la gravedad del diagnóstico, es necesario confirmar o invalidar los resultados de la prueba de cribado mediante otra técnica. Los expertos de la OMS recomiendan la inmunotransferencia (WESTERN BLOT).

Esta técnica permite caracterizar los anticuerpos dirigidos contra cada proteína vírica, confirmando así la seropositividad o bien identificando posibles inespecíficas.

El equipo NEW LAB BLOT 1 incluye los reactivos necesarios para realizar las pruebas confirmatorias mediante inmunotransferencia.

#### **PRINCIPIOS DE LA PRUEBA.**

La prueba se basa en una técnica de ELISA indirecta sobre una tira de nitrocelulosa que contiene todas las proteínas constituyentes del VIH-1 y un control interno anti-IgG. La banda correspondiente al control interno se encuentra en el extremo de la tira, sin ningún número, antes de la reacción P18 y permite validar la adición de la muestra y los reactivos, así como el progreso correcto del procedimiento.

Las proteínas del VIH1 inactivadas se separan de acuerdo con sus pesos moleculares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en medio disociativo y reductor posteriormente se transfieren eléctricamente a una hoja de membrana nitrocelulosa.

El procedimiento comprende los siguientes pasos:

1. **Rehidratación de la tira**
2. **Incubación de las muestras a confirmar.**  
Si hay anticuerpos “anti-VIH-1”, se unen a las proteínas víricas identificadas, presentes en la tira.
3. **Después de lavar se incuban los anticuerpos “anti-IgG” humana marcada con fosfatasa alcalina. El conjugado se une a los anticuerpos “anti-VIH-1” capturados en la fase solida.**
4. **Después de lavar tirar el conjugado, la solución del revelado del color permite demostrar la actividad enzimática de los complejos unidos a la nitrocelulosa.**
5. **El aspecto de las bandas coloreadas específicas permite demostrar la presencia de anticuerpos “anti-VIH-1” en la muestra.**

#### Contenido Del Equipo

Todos los reactivos están diseñados para uso exclusivamente en diagnóstico “in vitro”. Cada equipo contiene reactivos suficientes para 18 determinaciones. Las determinaciones pueden realizarse en múltiples manipulaciones independientes.

#### **Etiqueta Presentación**

#### **Composición Del Reactivo**

<b>R1</b>	<b>VIH-1 NITROCELLULOSE STRIP</b>	Tira de nitrocelulosa de VIH-1 activada mediante transferencia de proteínas víricas del VIH-1 y control interno anti-IgG.	18 tiras en 3 bandejas
<b>R2</b>	<b>BUFFER SOLUTION/DILUENT (5X)</b>	Solución de lavado/diluyente (concentrado 5x) contiene cloroformo al 0.5%	1 frasco 100 ml
<b>R3</b>	<b>NEGATIVE CONTROL</b>	Control negativo suero humano negativo para HBsAg, anti-VIH-1 y anticuerpos anti-HCV Conservante: acida sódica < 0,1%	1 frasco 0.2 ml
<b>R4</b>	<b>ANTI-VIH-1 POSITIVE CONTROL</b>	Control positivo anti-VIH-1 suero humano positivo para anticuerpo anti-VIH-1 negativo para anticuerpos anti-HCV y HBsAg inactivado por calor Conservante: acida sódica < 0,1%	1 frasco 0.2 ml
<b>R5</b>	<b>CONJUGATE</b>	Conjugado anticuerpo de carnero anti-IgG humana marcados con fosfatasa alcalina Conservante: acida sódica < 0,1%	1 frasco 40 ml
<b>R6</b>	<b>CONTROL DEVELOPMENT SOLUTION (BCIP/NBT)</b>		1 frasco 40 ml

### Reconstitución De Reactivos Y Conservación

Cada equipo contiene reactivos suficientes para 18 determinaciones. Las determinaciones pueden realizarse en múltiples valoraciones independientes.

Reactivos listos para usarse

R1: tiras de nitrocelulosa de VIH-1

R3: control negativo

R4: control positivo anti-VIH-1

R5: conjugado

R6: solución de revelado del color (BCIP/ NBT)

REACTIVO A RECONSTITUIR

R2: solución de lavado/diluyente (5x)

### Conservacion

Conserve el equipo a 2 a 8 °C una vez abierto, todos los reactivos pueden conservarse a esta temperatura hasta la fecha de caducidad indicada en la caja.

### Recogida y Manipulacion De La Muestra.

Recoger una muestra de sangre según las practicas actuales.

Las pruebas deben realizarse con muestras de suero o plasmas no diluidas (EDTA, heparina, citrato). Extraiga el suero o el plasma del cagulo o los globulos rojos cuanto antes para evita la hemolisis.

Una hemolisis excesiva puede afectar el rendimiento de la prueba. Las muestras con agregados deben aclararse mediante centrifugación antes de hacer la prueba. Las muestras con agregados deben aclararse mediante centrifugación antes de hacer la prueba. Las partículas de fibrina suspendidas o los agregados pueden dar resultados falsamente positivos.

Las muestras pueden conservarse de 2-8 °C si la prueba se reliza en 7 dias o se pueden congelar profundamente a -20 °C. las muestras de plasma se deben descongelar rápidamente calentándolas durante unos minutos a 40°C (para limitar la precipitación de la FIBRINA)

No se deben usar las muestras que se hayan congelado o descongelado más de tres veces. Si se deben enviar las muestras deben envasarse de acuerdo con las normas en vigor para el tranporte de agentes etiológicos.

**NO USAR MUESTRAS DE SUERO O PLASMA CONTAMINADAS, HIPERLIPIDEMICAS O HIPERHEMOLISADAS.**

NOTA: las muestras con hasta 90 g/l de albumina, 100mg/l de bilirrubina, las muestras lipidemicas con hasta el equivalente a 36 g/l de trioleina y las muestras hemolizadas con hasta 10 g/l de hemoglobina no afectan los resultados de la prueba.

### Procedimiento De Prueba.

1. Antes de usarlos es necesario esperar 30 minutos para permitir que los reactivos se estabilicen a temperatura ambiente (18-30°C)  
Retirar la cubierta transparente de la bandeja que se va a usar.  
Asegurarse de que el lado de la tira con la marca de referencia y el numero esta visible, de manera que las proteínas víricas de este lado se cubran con los diversos medios de reacción durante la prueba. Las tiras se deben manejar cuidadosamente con tenacillas de plástico. Y no permitir que las tiras se sequen por mas de 10 minutos durante la prueba.

**Los controles suministrados deben utilizarse en paralelo con las muestras en cada serie de pruebas. El control positivo es necesario para validar e interpretar correctamente las bandas.**

2. Añada 2 ml, de la solución de lavado/diluyente reconstituida a cada celdilla.  
Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (18-30°C) bajo agitación.
3. Añadir 20 microlitros de cada suero de muestra a la celdilla correspondiente.  
Incubar durante 2 horas y 5 minutos a temperatura ambiente (18-30°C) bajo agitación.
4. Vacie completamente el contenido de cada celdilla usando una bomba de vacío con un colector que contenga un desinfectante (lejía al 25%)  
Asegurese de que la tira no se mueve durante la aspiración; use el pozo de aspiración previsto para este fin.

Lave cada tira con 2 ml de solución de lavado/diluyente reconstituida y retírela inmediatamente mediante aspiración siguiendo las mismas precauciones.

Lave 2 veces cada tira, permitir el contacto durante 5 minutos, bajo agitación con 2 ml de la solución de lavado/diluyente reconstituida (esto es un total de 3 pasos de lavado).

Retirar la solución empleada para el ultimo lavado.

5. Dispensar 2 ml de conjugado a cada celdilla, la solución conjugada debe estabilizarse previamente a temperatura ambiente.  
Incubar durante 1 hora y 5 minutos a temperatura ambiente (18-30°C) bajo agitación
6. Lavado: proceder como se describió en el paso 4
7. Dispensar 2 ml de solución de revelado del color en cada celdilla.  
Si ha partículas suspendidas en la solución de revelado, permita que se depositen en el vial antes de pipetear (estas partículas no interfieren con la prueba)  
Incube bajo agitación y vigilar el aspecto de la coloración. Deben observarse todas las bandas correspondientes a las proteínas víricas con el suero de control positivo.(tiempo del revelado 5 minutos al menos).
8. Detenga la reacción retirando la solución de revelado y enjugando las tiras 3 veces con agua destilada.
9. Seque las tiras entre 2 hojas de papel absorbente a temperatura ambiente (18-30°C)  
Clasificar las tiras, colocarlas perfectamente usando la marca de referencia, valídes y posteriormente interprete.

**PRECAUCION:** no pegar la banda de plástico adhesivo en el lado de la tira correspondiente a las proteínas víricas.

### **Validacion, Lectura E Interpretacion De Los Resultados.**

#### Validación:

La banda de control interno anti-IgG debe estar presente con un color fuerte. Permite validar la adición de la muestra, los reactivos, así como el progreso correcto del procedimiento de prueba. La ausencia o la intensidad débil de la coloración de la banda de control interno anti-IgG indican que la muestra o los reactivos no se dispensaron o que no se siguió el procedimiento de la prueba.

Control positivo: están presente todas las bandas correspondientes a las proteínas virales y la banda control.

Control negativo: no debe aparecer ninguna proteína viral y únicamente está presente la banda control.

#### Lectura:

La presencia de anticuerpos anti-proteínas constituyentes del VIH-1 en las muestras controladas se demuestra por la aparición de bandas coloreadas específicas (azul-Purpura). Su posición corresponde a las masas moleculares de las proteínas víricas enumeradas en la tabla siguiente.

**IMPORTANTE:** utilizar el control positivo para localizar e identificar los anticuerpos revelados y se deben interpretar cada banda específica revelada.

DENOMINACIÓN	GENOMA	NATURALEZA	ASPECTO EN LA INMUNOTRANSFERENCIA
GP 160	ENV	Glucoproteína precursora de GP 110/120 y GP 41	Bandas con bordes difusos
GP 110/120	ENV	Glicoproteínas de envuelta	Bandas con bordes difusos
P 68/66	POL	Transcriptasa inversa	Banda clara
P 55	GAG	Precursor de la proteína del núcleo	Doblete
P 52/51	POL	Transcriptasa inversa	Banda clara
GP 41	ENV	Glucoproteína transmembrana	Banda difusa
P 40	GAG	Precursor de la proteína del núcleo	Banda clara
P 34/31	POL	Endonucleasa	Banda clara
P 24/25	GAG	Proteína núcleo	Banda clara
P 18/17	GAG	Proteína núcleo	A veces un doblete

Interpretación:

INTERPRETACION	CRITERIO DE LA OMS	CRITERIOS DE LA CRSS
Positivo	2 ENV + GAG + POL	1 ENV + (1 GAG o 1 POL)
Indeterminado	1 ENV + GAG + POL GAG + POL GAG POL	GAG+ POL GAG POL ENV
Negativo	Sin bandas Bandas no clasificadas	Sin bandas Bandas no clasificadas

OMS: organización mundial de la salud

CRSS: Consortium for retrovirus serology standardization

Rendimientos:**Especificidad de muestras que puedan presentar reacciones cruzadas.**

Se analizaron con el NEW LAV BLOT 1 muestras negativas en VIH-1 con Elisa y positivas en alguno de los virus o patologías siguientes: HBV, HCV, HTLV, HSV, EBV, VZV, CMV, HAMA, RF, ANA, Toxoplasmosis; así como muestras de mujeres embarazadas.

MUESTRA	RESULTADO
5 mielomas, 4 HBV, 5HSV IgG	Todos negativos
5 HAMA	1 indeterminado (p25)
5RF	2 indeterminados (leve p18)
5 ANA	3 indeterminados (leve p68,p55,p34)
5 Mujeres embarazadas	1 indeterminado (p52)
4 HTLV	1 indeterminado (p55)
4HCV	1 indeterminado (p55,p18)
5CMV IgG	1 indeterminado (p25)
EBV IgG	2 indeterminado (p55,p25)
5VZV IgG	1 indeterminado (leve p55)
5 Toxo IgG	1 indeterminado (p18)

48 muestras resultaron negativas y 14 resultaron indeterminadas: 3 p25, 3 p18, 5 p55, 1 p52, 1 p34, 1 p52. Ninguno resultado positiva. Se obtuvieron los mismos resultados tanto con los criterios de interpretación de la OMS como con los del CRSS.

Sensibilidad en muestras positivas en VIH-1

Se analizaron con el NEW LAV BLOT 1 203 muestras que resultaron positivas en VIH-1 con Elisa: 5 con VIH del grupo O, 8 en la fase inicial de la infección (antígenos o carga viral positiva) y 84 muestras procedentes de distintos países, (CHINA NIGER, INDIA). Según los criterios empleados, se obtuvieron los siguientes resultados:



Muestras	Numero de muestras	Criterio OMS 2ENV+GAG+POL		CRITERIO CRSS 1 ENV+(1GAG O 1 POL)	
		indeterminados	positivos	indeterminados	positivos
VIH positivo	203	8	195	1	202
		4%	96%	0,5%	99.5%

Criterios OMS y criterios CRSS

Sensibilidad de paneles de seroconversión

Se analizaron con el NEW LAV BLOT 1 55 muestras procedentes de 17 paneles de seroconversión (BBI, NABI y BCP) y 10 muestras de 4 pacientes hospitalizados, es decir, 21 paneles de seroconversión en total.

Muestras	Criterio OMS 2ENV+GAG+POL			CRITERIO CRSS 1 ENV+(1GAG O 1 POL)		
	Positivas	indeterminados	Negativas	positivas	indeterminados	Negativas
66	2	46	17	37	11	17
	3%	71%	26%	57%	17%	26%

**En conclusión el empleo de los criterios de CRSS aumenta la sensibilidad de a prueba con una reducción significativas del numero de resultados indeterminados en beneficio de resultados positivos.**

Reproducibilidad.  
Intraensayo

Se analizaron 6 veces en el mismo ensayo una muestra negativa en VIH y 3 muestras positivas diluidas (2 leves y 1 media) las interpretaciones se hicieron con los 2 criterios. Se obtuvieron los mismos resultados tanto con los criterios de interpretación (OMS o CRSS).

Interensayo

Se analizaron durante 5 días una muestra negativa en VIH y 6 muestras positivas diluidas (3 leves, 3 medias) y 3 muestras positivas fuertes. Las interpretaciones se hicieron con los 2 criterios. Se obtuvieron los mismos resultados tanto con los criterios de interpretación (OMS, CRSS).

#### Limitaciones de la prueba.

- la variabilidad de los virus VIH-1 (Grupo M, Grupo O) y VIH-2 no permite descartar la posibilidad de falsos negativos. Ningún método conocido puede ofrecer garantías de ausencia del virus VIH.
- Durante la primera fase de la infección puede darse el caso de que una prueba de detección de resultado positivo y la prueba de confirmación de negativo; por tanto, un resultado negativo indica que la muestra analizada no contiene anticuerpos anti-VIH detectables por el NEW LAV BLOT I. sin embargo, dicho resultado no permite descartar la posibilidad de una infección reciente por VIH-1 o VIH-2, por lo que se recomienda analizar posteriormente una nueva muestra.
- La presencia de una sola banda ENV. Para una muestra confirmada como positiva con NEW LAV BLOT 1 según los criterios del CRSS no excluyen la posibilidad de una infección por VIH-2.
- Un resultado indeterminado no permite descartar una seroconversión, infección por VIH-2 o reacción cruzada debido a otro retrovirus.
- **Un perfil atípico con leves reacciones en las proteínas de la envoltura (GP 120/ GP 160) en contraste con un positivo claro en las proteínas procedentes de GAG y POL debe hacer pensar en la posibilidad de una infección por un VIH-2 o un VIH-1 del grupo O y necesitara de análisis complementarios.**