

302827

7
24



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A.C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

**ESTUDIO SEROLOGICO EN DONADORES DE SANGRE
INDETERMINADOS AL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA TIPO-I (VIII-I), EN LA PRUEBA DE
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT).**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA
MARIA ELENA GALLARDO RESENDIZ.

México, D.F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

CAPITULO I.

INTRODUCCION.

1.1 Planteamiento del problema	2
1.2 Objetivos	3
1.3 Hipótesis	3

CAPITULO II.

ANTECEDENTES.

2.1 Retrovirus	5
2.1.1. Clasificación y Nomenclatura	5
2.1.2 Diferencias y Semejanzas	6
A) Diferencias entre el VIH-1 y el VIH-2	7
B) Semejanzas entre el VIH-1 y el VIH-2	7
2.2 Estructura Genética del VIH-1.....	8
2.3 Características de la Interacción virus-huésped	9
2.4 Interacción virus-célula	13
2.5 Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida	16
2.6 Clínica de la infección por VIH	18
2.6.1 Historia natural de la infección por el VIH	18
2.6.2 Clasificación y estadios de la infección por el VIH	19
2.6.3 Marcadores Biológicos de progresión a SIDA	23
2.6.4 SIDA pediátrico	23
2.7 Diagnóstico	26

2.7.1 Prueba de aglutinación de partículas (SERODIA VIH)	27
2.7.2 Aplicaciones de la técnica ELISA para el síndrome de inmunodeficiencia adquirida	
Diagnóstico indirecto	27
2.8 Prueba confirmatoria: Ensayo cualitativo para la detección e identificación de anticuerpos al VIH	29
2.9 Indeterminados al VIH	30

CAPITULO III.

PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 Diagrama experimental	35
3.2 Material biológico	37
3.2.1 Material de laboratorio	38
3.3 Metodología	40
3.3.1 SERODIA VIII	40
3.3.2 Du Pont VIH-I ELISA	45
3.3.3 ABBOTT VIH-I EIA RECOMBINANTE	51
3.3.4 Organon Vironostika anti-HTLV-III	54
3.3.5 Behring Enzygnost Amicro	59
3.3.6 Western blot VIH-I	63

CAPITULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1 Resultados	72
4.2 Discusiones	75

CAPITULO V.

CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFIA	82
APENDICE	93

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad que amenaza de manera sustancial la vida del hombre. Hasta hoy, no se cuenta con medicamento alguno que permita recuperar la salud del enfermo, ni vacuna que prevenga la infección por su agente causal, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). El avance de la epidemia a nivel mundial es motivo de preocupación general, por su rápida velocidad de expansión y letalidad. Ante esta situación, las reacciones sociales han sido de lo más diverso e impredecible: desde el desconcierto y la incertidumbre pasando por la renovación de mitos y la creación de otros, hasta la preocupación por generar conocimientos y prácticas que superen el desafío que representa el SIDA.

La pandemia apareció en el decenio de 1970, con un período de propagación inadvertida del virus. Los primeros casos de SIDA se reconocieron en 1981. En los años siguientes se identificó el virus, se determinaron los modos de propagación y se desarrollaron métodos de laboratorio para detectar los anticuerpos del VIH. La infección se puede transmitir por las relaciones sexuales, de manera parenteral o de madre a hijo antes, durante o poco después del parto. El riesgo de transmisión varía según el modo de ésta. En los casos de transfusión de sangre infectada, la probabilidad de infección puede ser superior al 90%; en la transmisión perinatal por la madre del 25-50%; y en cada perforación de la piel con una aguja infectada inferior al 1% (13). La persona infectada por el VIH se convierte en una posible fuente de infección de por vida, aun cuando no presente síntomas.

El SIDA clínico puede no aparecer durante muchos años, pero casi la mitad de las personas

infectadas se enferman de SIDA en un plazo de 10 años. La defunción se produce prácticamente siempre en los dos años posteriores al diagnóstico de SIDA (20). Los primeros casos de SIDA en México se presentaron en 1983. La infección por VIH alcanzó prevalencias de hasta el 7% en donadores remunerados en 1986. En consecuencia se estableció la obligatoriedad de detectar la infección por VIH en donadores y a partir de 1987 se prohíbe la comercialización de la sangre (69).

1.2 OBJETIVOS

- 1.- Determinar la seroprevalencia de infección por VIH en donadores sanguíneos durante un periodo de 1 año .
- 2.- Corroborar la reactividad sérica en donadores del Distrito Federal utilizando diferentes marcas de equipos de ELISA'S y de aglutinación de partículas.
- 3.- Estudiar el patrón de respuesta en Western Blot de los sueros indeterminados y reactivos en alguna prueba de Tamizaje.

1.3 HIPOTESIS

Si la prevalencia de infección por VIH en donadores altruistas es baja, entonces el valor predictivo positivo en las pruebas utilizadas también será bajo por lo que se espera obtener resultados falsos positivos, para los cuales se pueden encontrar diferentes patrones de respuesta en Western Blot.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 RETROVIRUS.

2.1.1 CLASIFICACION Y NOMENCLATURA

La familia de los Retrovirus se compone de 3 subfamilias: Oncovirus, Espumavirus y Lentivirus.

-Los oncovirus (retrovirus oncogénicos o productores de cáncer) incluyen al HTLV-I y II.

-Los spumavirus incluyen algunos virus bovinos, felinos, simios y humanos, que persisten en sus hospederos sin producir enfermedad.

-Los lentivirus son responsables de diversos padecimientos neurológicos, músculo-esqueléticos, hematológicos y respiratorios en mamíferos, que se manifiestan después de largos periodos de incubación. Los lentivirus atacan fundamentalmente a las células inmunológicas (linfocitos T cooperadores y células del sistema fagocítico mononuclear) a las cuales destruyen conduciendo con ello al síndrome de inmunodeficiencia en los humanos, pertenecen a este grupo el VIH-I y VIH-2.

Al agente etiológico actualmente se le ha otorgado el nombre de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), anteriormente conocido como: LAV por Luc Montagnier y colaboradores en el instituto Pasteur de Francia en 1983. HTLV-III por Robert Gallo y colaboradores en Instituto Nacional de Cáncer de los EUA, en 1984. ARV por Jay Levy y colaboradores de la Escuela de Medicina de la Universidad de San Francisco en 1984. La organización mundial de la salud (OMS) recomienda a su vez el uso de sus nombres equivalentes en francés y español: virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (9).

2.1.2 DIFERENCIAS Y SEMEJANZAS.

Los retrovirus humanos conocidos hasta el momento, presentan algunas características semejantes que son comunes a todos.

- Mecanismo de transmisión.
- Afinidad por los linfocitos T-4.
- Capacidad de alterar células T-4 in vitro.
- Presencia de un gen regulador "tat" (adicional a los tres comunes a todos los retrovirus que son los genes estructurales "gag", "pol" y "env").

Biológicamente, el VIH-2 es muy similar al VIH-1. El genoma del HIV-2 comparte de un 40-45% de homología con el VIH-1 siendo éste el que causa mayores consecuencias patológicas; el VIH-2 tiene un periodo de latencia mas largo, no obstante que presenta algunos cambios proteínicos. (56)

Los virus HTLV-I y el HTLV-II comparten muchas de sus características y un 65% de su secuencia nucleotídica.

El genoma del HTLV-II está constituido por genes estructurales y reguladores, ambos similares a los del VIH. Entre la región env y 3'LTR se encuentra la región X, exclusiva de los HTLV. En ella pueden distinguirse dos genes: el gen TAX, que codifica una proteína (tat o p40) que estimula la replicación vírica y parece relacionarse con la capacidad oncogénica del virus, y el gen REX que interviene en el control de la expresión genética, y es esencial para la replicación vírica.

Comparados con el VIH, los HTLV muestran mucho menor variabilidad genética, posiblemente

debido a su relativamente escasa replicación vírica (2).

Desde el punto de vista morfológico también son muy similares entre si, las diferencias más sobresalientes entre el HTLV-I y el HTLV-II con el VIH es que presentan una estructura nuclear cilíndrica condensada que no se observa en los dos primeros. Además el VIH posee cuando menos otros tres genes adicionales que son *vif*, *nef* y *vpu* (8).

Aún cuando estos virus HTLV's son similares en muchos aspectos a los VIH's, estos presentan antígenos diferentes por lo que los HTLV no presentan un problema en el diagnóstico cuando se realizan pruebas para detectar anticuerpos al VIH. Los anticuerpos contra los antígenos del HTLV generalmente no presentan reacción cruzada con los antígenos del VIH. Cuando más, puede presentarse una reactividad cruzada menor entre la p24/p26 antígenos del "core". Los mayores antígenos de los HTLV's incluyen las proteínas del gen "gag" p19 y p24, y las glicoproteínas gp61/68, serológicamente los anticuerpos contra el HTLV-I y HTLV-II no pueden ser diferenciados entre si (56).

A) DIFERENCIAS ENTRE EL VIH-1 Y EL VIH-2.

El VIH muestra la misma morfología, linfotropismo y efecto citopático que el VIH-2 sin embargo se han encontrado diferencias en el genoma con pruebas de hibridación. Para el caso de estos dos retrovirus sólo se ha encontrado cierta complementariedad en las regiones de los genes "gag" y "pol" (que son los mas conservados del genoma). Al parecer el VIH-1 es más virulento que el VIH-2 (8).

B) SEMEJANZAS ENTRE EL VIH-1 Y EL VIH-2.

Dos distintos virus, pero relacionados, son los responsables del síndrome clínico del SIDA.

Estos virus son designados como el VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es predominantemente más común en África Central, mientras que el VIH-2 es más frecuente en el Este de África (56). El genoma del VIH-2 tiene 9,671 bases y difiere aproximadamente en 60% con el del VIH-1. La organización de los genes es similar a la del VIH-1, es decir, hay dos segmentos distales (LTR) entre los que se encuentran tres genes estructurales: gag, pol y env, además existen seis genes más: tat, rev, nef, vif, vpr y vpx. De estos seis genes, sólo cinco están relacionados con los del VIH-1, ya que el vpx del VIH-2 no tiene análogo en el VIH-1.

La mayor similitud entre el VIH-1 y el VIH-2 es a nivel de las proteínas del "core", es decir, las codificadas por los genes gag y pol. Esto explicaría la reactividad cruzada que existe entre ambos virus (2).

En algunas investigaciones serológicas se ha encontrado que los antígenos de envoltura del VIH-2 (LAV-2/SBL-6669) y del SIV-III tienen el mismo peso molecular y presentan reacciones cruzadas por lo que el VIH-2 parece estar más estrechamente relacionado al SIV-III que al VIH-1 (10,11).

2.2 ESTRUCTURA GENETICA DEL VIH-1

El provirus del VIH integrado a los cromosomas de las células infectadas posee dos grupos de genes: estructurales y reguladores. Los genes estructurales son: gag, pol y env; los genes reguladores son LTR, vpr, vpu, tat y los genes de acción desconocida son vif y nef.

La estructura genética del VIH es completamente nueva y diferente a los otros retrovirus pues posee una región central "vpr" que separa los genes pol y env, además del gen "env" que codifica las proteínas de la envoltura es mayor que el resto de los retrovirus.

El gen "gag" sintetiza una poliproteína p53/55 que da lugar a tres proteínas maduras que forman la nucleocápside. Estas proteínas son la p17/18, p24/25 y p9/6 que son las que envuelven al RNA. La proteína p24/25 es la proteína principal de la nucleocápside; es altamente inmunogénica y hasta el 50% de los pacientes presentan anticuerpos contra ellas.

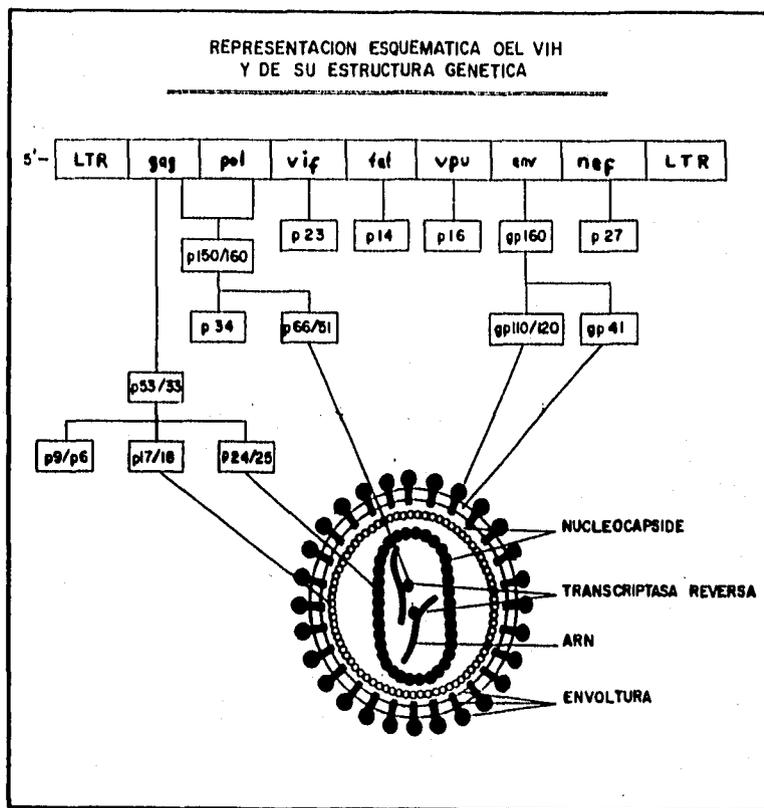
El gen "pol" codifica la transcriptasa reversa, codifica primero un precursor de 160 Kd que debe de ser procesado para dar la enzima activa (p66/51). La polimerasa codificada para este gen tiene tres dominios funcionales conservados en todas las secuencias analizadas hasta el momento en los distintos retrovirus ya que sus funciones son cruciales para la replicación viral.

El gen "env" precursor de la p160 codifica la síntesis de las glicoproteínas de la membrana de la envoltura del virus, gp41 que ocupa todo el espesor de la membrana de la envoltura y la gp110/120 que se localiza en el exterior de la misma. Este gen tiene secuencias hipervariables. La glicoproteína 110/120 es la responsable de que el VIH reconozca y se adhiera exclusivamente a células portadoras del marcador biológico CD-4 (T-4) presente en los linfocitos T cooperadores/efectores y en las células del sistema fagocítico mononuclear (17,18). Ver figura No.1

2.3 CARACTERISTICAS DE LA INTERACCION VIRUS-HUESPED. (Respuesta Inmune e historia natural).

El VIH se replica e infecta con preferencia a los linfocitos CD4, pero también infecta a macrófagos, por lo que puede detectarse en cualquier fluido o tejido corporal que contenga estas células. El VIH se ha aislado de la sangre, productos de la sangre, semen, secreciones genitales femeninas, leche materna, líquido cefalorraquídeo, saliva, lágrimas, etc. Hay gran cantidad de

FIGURA 1



Explicación de la Figura No. 1.

PROTEINAS ESTRUCTURALES

<u>GENES</u>	<u>PROTEINAS</u>	<u>CARACTERISTICAS Y/O FUNCIONES</u>
gag	p55 Proteína precursora de:	Antígenos de grupo. Internos.
	p17	Proteína miristilada de la matriz.
	p24	Proteína de la cápside.
	p15 Proteína precursora de:	Proteínas de la nucleocápside
	p7	Proteína unida al ácido nucleico.
	p6	Nucleocápside.
pol	p90 Proteína precursora de	Enzimas
	p10	Proteasa
	p13	RNasa H
	p66,p55	Transcriptasa inversa
	p34	Integrasa
env	p160 Proteína precursora de	Proteínas de la envoltura
	gp120	Proteína de envoltura, superficie (VIH-1)
	gp 41	Proteína de envoltura, transmembrana (VIH-1).
	p300 Proteína precursora de	Proteínas de la envoltura
	gp125	Proteína de envoltura, superficie (VIH-2)
	gp 36	Proteína de envoltura, transmembrana (VIH-2)

PROTEINAS REGULADORAS

GENES	PROTEINAS	CARACTERISTICAS Y/O FUNCIONES
tat	p14	Transactivador de todas las proteínas
rev (art, trs)	p19	Regulador de la expresión de las proteínas virales (rotura y transporte de RNAm precursores). Transporte selectivo de RNAm en el citoplasma.
nef (3'orf)	p27	Desconocida. No ejerce acción negativa sobre el crecimiento viral ni en el mantenimiento del estado de latencia.
vif (sor)	p23	Proteína asociada a la infecciosidad del virión, se necesita para la infecciosidad de los viriones extracelulares.
rap (vpr)	p15	Situada entre vif y tat. Acelerador del ciclo de replicación. Actúa en trans aumentando la tasa de producción de proteínas.
vpt	p17 (Tev o Tnv)	Desconocida. La proteína se codifica por fragmentos de tres genes diferentes: tat, env y rev.
out (vpu)	p16	Sólo en VIH-1. Aumenta la liberación de viriones de la célula infectada, reduciendo la acumulación de proteínas virales. Reduce la formación de sincicios y la muerte celular en células T humanas CD4+. Podría aumentar el título de virus presente en la persona infectada.
vpx	p16	Proteína de 113 aa; sólo en VIH-2 y VIS.

estudios que indican que la saliva, las lágrimas y la orina aunque contengan virus, usualmente no transmiten la enfermedad.

La transmitibilidad tras la exposición a fluidos o secreciones infectadas parece depender de:

- Cantidad de virus infeccioso presente y del espécimen infectado.
- De la vía de transmisión.
- De la condición de salud de la persona infectada.
- De la cepa viral.

La transmisibilidad aumenta en los estadios más avanzados de la infección, así como cuando ya hay clínica de enfermedad. También se ha asociado una mayor transmisibilidad con enfermedades genitales ulceradas.

La susceptibilidad parece ser universal. Se desconocen qué factores del huésped influyen para que la infección por VIH no ocurra siempre tras una o varias exposiciones. De cualquier forma la posibilidad de transmisión depende de la prevalencia de la infección y de los factores de conducta.

Se calcula que entre un 10% a un 20% de las personas infectadas evolucionarán a SIDA dentro de los 5 años después de la seroconversión y alrededor de un 50% entre los 7 a 10 años.

El periodo de incubación es variable, siendo el tiempo que pasa desde la infección por VIH hasta el diagnóstico de la enfermedad. Varía entre dos meses y 10 años (mediana en adultos entre 7-8 años). (2)

2.4 INTERACCION VIRUS- CELULA.

A continuación se enlistan secuencialmente los eventos que se dan en la interacción virus-célula

RECONOCIMIENTO

El virus reconoce a la molécula CD-4 a través de la glicoproteína 110/120.

ADHERENCIA

El virus se adhiere a la membrana de la célula en una unión de tipo receptor-ligando.

ENTRADA

Una vez adherido, el virus penetra por un mecanismo de endocitosis mediado por receptores del interior de la célula huésped.

ACTIVACION DE LA ENZIMA TRANSCRIPTASA REVERSA

La enzima se activa y transcribe la información de su RNA en DNA de doble cadena.

INTEGRACION DEL DNA VIRAL

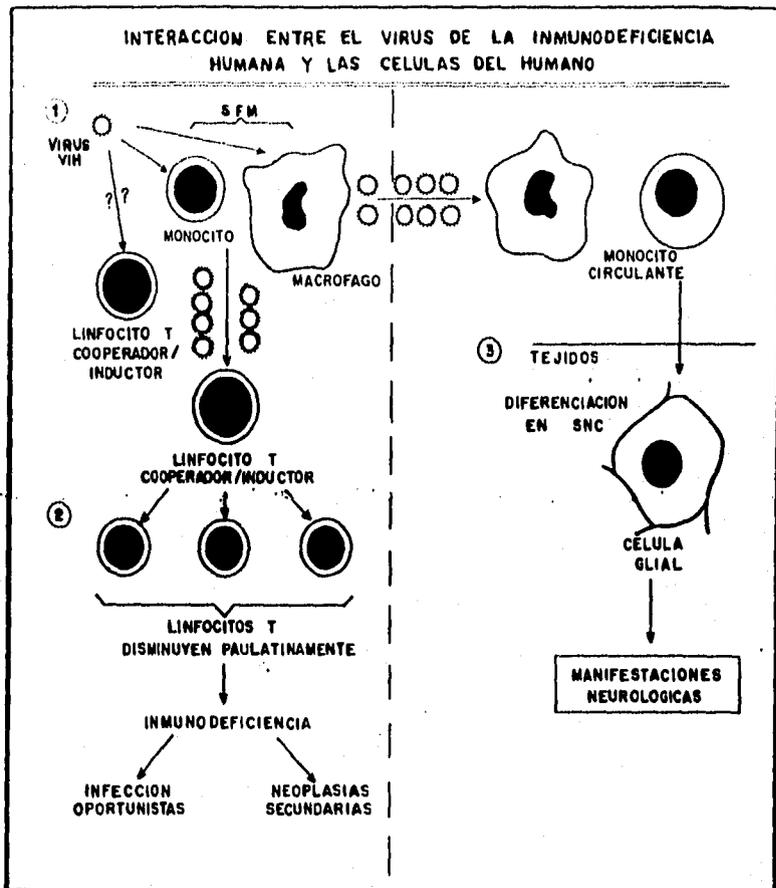
El DNA se integra al genoma de la célula huésped quedando entonces como provirus, este puede permanecer latente por mucho tiempo.

TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN DEL DNA VIRAL

El DNA viral es transcrito por la maquinaria celular formando RNA mensajero viral, este RNA mediante complejos mecanismos de regulación es procesado por la traducción y síntesis de proteínas virales o para los nuevos viriones.

ENSAMBLAJE

Las proteínas y el RNA viral se ensamblan utilizando la parte interna de la membrana celular.



SALIDA

La salida de nuevos viriones ocurre por gemación, la membrana celular envuelve a las proteínas y al RNA viral quedando libres los viriones en el exterior celular. La estructura de la cápside extraordinariamente rica en transcriptasa reversa e integrasa, probablemente lo haga más resistente a la inactivación, si esto fuese cierto, dicha estructura podría jugar un papel importante en la transmisión de la enfermedad. (7).

La infección de las células del Sistema fagocítico mononuclear probablemente explica la localización del virus en el recto, vagina, orofaringe y también podría ser la vía de entrada al SNC.

Se sabe que el producto del gen "tat" es indispensable para la replicación viral, aún cuando el RNA correspondiente se encuentre presente, pudiera ser que este gen juegue un papel importante en cuanto a la latencia de la infección. Lo que se ha pensado, es que las células T-cooperadoras en reposo (no estimuladas por un antígeno) pero infectadas con el virus, inhiban la función del gen "tat" así al ponerse en contacto estos linfocitos con su antígeno cesaría la inhibición, disparándose la replicación viral (9).

2.5 SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (VIH / SIDA).

Desde la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en México, el Sistema Nacional de Salud a través de la Dirección General de Epidemiología a recolectado los datos necesarios para la comprensión de la epidemiología del VIH/SIDA. El análisis de los datos obtenidos por medio de la vigilancia e investigaciones epidemiológicas ha permitido conocer la magnitud, distribución y frecuencia de la epidemia, caracterizar los factores de riesgo, definir los

patrones y tendencias que ha adquirido la transmisión del VIH, en relación con grupos poblacionales y áreas geográficas, elaborar predicciones respecto al número de casos de infectados, así diseñar y evaluar estrategias de intervención educativa (7). El SIDA es causado por el virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH), cuya transmisión es posible a través de las vías: sexual, sanguínea y perinatal ya que se localiza principalmente en algunos fluidos corporales como sangre, semen y secreciones vaginales de las personas infectadas (5).

El SIDA significa Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, estas cuatro palabras son descriptivas de la enfermedad que ocasionan.

SÍNDROME:

El SIDA se manifiesta a través de una serie de enfermedades y síntomas diversos que suelen ser fatales.

INMUNODEFICIENCIA:

El virus del SIDA hace que el cuerpo sea incapaz de combatir ciertas infecciones y enfermedades.

ADQUIRIDA:

El virus del SIDA se adquiere de manera externa.

El VIH pertenece a la familia Retroviridae subfamilia Lentiviridae, retrovirus que forman un eslabón entre los RNA-viral y DNA-viral. El flujo de información genética, usualmente se pensaba que era exclusivamente del DNA al RNA y de ahí a la síntesis de una proteína, por invertir este flujo de información este grupo de virus recibe el nombre de RETROVIRUS. Los

retrovirus almacenan la información genética en forma de RNA y poseen una enzima, la transcriptasa reversa, que les permite sintetizar DNA viral el cual se integra a los cromosomas de las células (provirus retroviral integrado) para servir en el futuro como base de la replicación viral. La infección por VIH puede cursar asintomática o presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que difiere en niños y adultos (5,55).

2.6 CLINICA DE LA INFECCION POR VIH:

2.6.1 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION POR EL VIH.

Se pueden distinguir:

1) Una fase aguda (varias semanas de evolución).

El paciente infectado permanece asintomático o presenta un síndrome mononucleósico durante la primoinfección (30-40% de los casos), que a menudo pasa inadvertido. Durante este proceso agudo puede haber una inmunodepresión transitoria, capaz de facilitar la aparición de algunas infecciones oportunistas, como candidiasis esofágica o infección por citomegalovirus.

Dentro de las 2-6 semanas posteriores al contagio irá apareciendo paulativamente el antígeno p24 circulante. El cultivo viral será positivo y una elevada proporción de linfocitos CD4 estarán infectados. Progresivamente se irán sintetizando los anticuerpos específicos y se desarrollará la inmunidad celular; a la vez que la viremia, la antigenemia y las células infectadas irán disminuyendo.

2) Una fase crónica de replicación viral activa (varios años de duración).

Durante esta fase, que suele durar varios años, la actividad replicativa viral persiste, aunque está limitada por la actividad del sistema inmunológico.

La probabilidad de que la infección progrese a estadios más avanzados es de un 50% a los 8-10 años de la primoinfección en adultos y de un 80% en niños. No parece que existan diferencias significativas en cuanto a la progresión a SIDA de homosexuales y drogadictos. De todos modos, diversas evidencias sugieren que los sujetos infectados por transfusiones evolucionan más rápidamente a SIDA que el resto, quizás por la exposición a un mayor inóculo viral y por presentar una edad más avanzada en el momento de la infección.

3) Una fase final o de crisis que clínicamente correspondería al complejo relacionado con el SIDA (CRS) y al SIDA.

El incremento de la actividad replicativa del virus coincide clínicamente con la aparición de una severa alteración del estado general, (síndrome de desgaste) infecciones oportunistas, neoplasias o alteraciones neurológicas. A partir de este momento se establece el diagnóstico de SIDA.

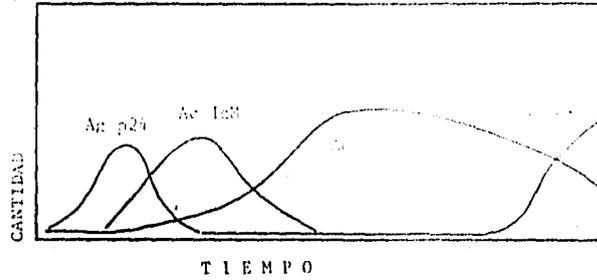
Por ahora, los mejores resultados se han conseguido con el tratamiento con AZT, y hablan de una supervivencia del 50-75% a los 2-3 años. El pronóstico mejora si a las 6-12 semanas de haber iniciado la terapia asciende la cifra de los linfocitos CD4 y disminuyen los niveles de B2-microglobulina sérica. (2) (ver figura 3)

2.6.2 CLASIFICACION Y ESTADIOS DE LA INFECCION POR EL VIH.

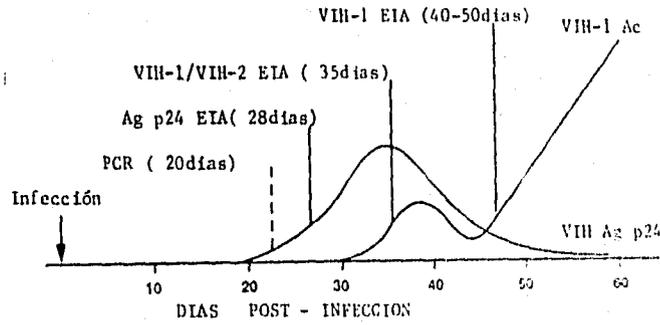
Para establecer el diagnóstico de SIDA se han diseñado varias clasificaciones clínicas. La más utilizada ha sido la clasificación del Center for Diseases Control (CDC). En 1990 la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una nueva clasificación que considera, a la vez, las manifestaciones clínicas y parámetros inmunológicos. Aunque esta clasificación no está todavía generalizada, probablemente es la más idónea para estudiar la enfermedad. (2)

FIGURA 3

SEROLOGIA TIPICA INDICATIVA DE INFECCION CON VIH.



VENTANAS DE SEROCONVERSION DESPUES DE INFECCION CON VIH



CLASIFICACION DEL CDC:

- Grupo I Infección aguda (hay que demostrar seroconversión)
- Grupo II Infección asintomática
- Grupo III Adenopatías generalizadas persistentes
- Grupo IV Otras enfermedades
- Subgrupo A Enfermedad constitucional. Fiebre de más de 1 mes junto con pérdida de >10% o diarrea de más de 1 mes.
- Subgrupo B Trastornos neurológicos, demencia, mielopatía o neuropatía periférica.
- Subgrupo C Enfermedades infecciosas asociadas al VIH-1.
- Subgrupo D Neoplasias asociadas al VIH, sarcoma de Kaposi, linfomas no hodgkinianos o primarios del sistema nervioso central.
- Subgrupo E Otras enfermedades, deben incluir a los pacientes con clínica relacionada con el VIH-1 y no incluidos en los subgrupos anteriores. (2)

CLASIFICACION DE LA OMS:

Esta clasificación es la más reciente y tiene la ventaja de combinar parámetros clínicos y biológicos.

CLASIFICACION DE LA INFECCION POR VIH PROPUESTA POR LA OMS.

ESTADIO I.

Paciente asintomático. Adenopatías generalizadas persistentes.

Nivel I: asintomático, actividad normal.

ESTADIO 2.

Pérdida de peso de menos del 10% del peso habitual.

Manifestaciones cutáneas mínimas (dermatitis seborreica, prurito, onicomicosis, úlceras orales recurrentes)

Herpes zoster durante los últimos 5 años.

Infecciones respiratorias altas recurrentes (p.ej., sinusitis bacteriana)

Y/o nivel 2: presencia de síntomas, actividad normal.

ESTADIO 3.

Pérdida de peso de más del 10% del peso habitual.

Diarrea crónica no explicada de más de 1 mes de evolución.

Fiebre prolongada (constante o intermitente) no explicada de más de 1 mes de evolución.

Candidiasis oral. Leucoplaquia oral vellosa. Tuberculosis pulmonar durante el último año.

Infecciones bacterianas severas (p.ej., neumonía).

Y/o nivel 3: paciente encamado menos del 50% del tiempo el último mes.

ESTADIO 4.

Síndrome de desgaste según la definición del CDC.

Neumonía por P. carinii. Toxoplasmosis cerebral. Criptosporidiosis con diarrea de más de 1 mes.

Criptococosis extrapulmonar. Enfermedad por CMV con afectación de otros órganos aparte del hígado, bazo y ganglios linfáticos.

Infección por el virus del herpes simple mucocutáneo de más de 1 mes de duración o visceral de cualquier duración. Leucoencefalopatías multifocal progresiva.

Cualquier micosis endémica diseminada (p.ej., histoplasmosis, coccidioomicosis).

Candidiasis esofágica, traqueal, bronquial o pulmonar. Infección diseminada por micobacterias atípicas. Sepsis por Salmonella sp diferente a S.typhi. Tuberculosis extrapulmonar. Linfoma. Sarcoma de Kaposi.

Sepsis por Y/o nivel 4: paciente encamado más de 50% del tiempo el último mes. (2) (ver figura 4)

2.6.3 MARCADORES BIOLÓGICOS DE PROGRESIÓN A SIDA.

El porcentaje o el número reducido de células CD4+ circulantes y, de modo menos específico, la linfopenia constituyen probablemente los parámetros de mayor valor predictivo.

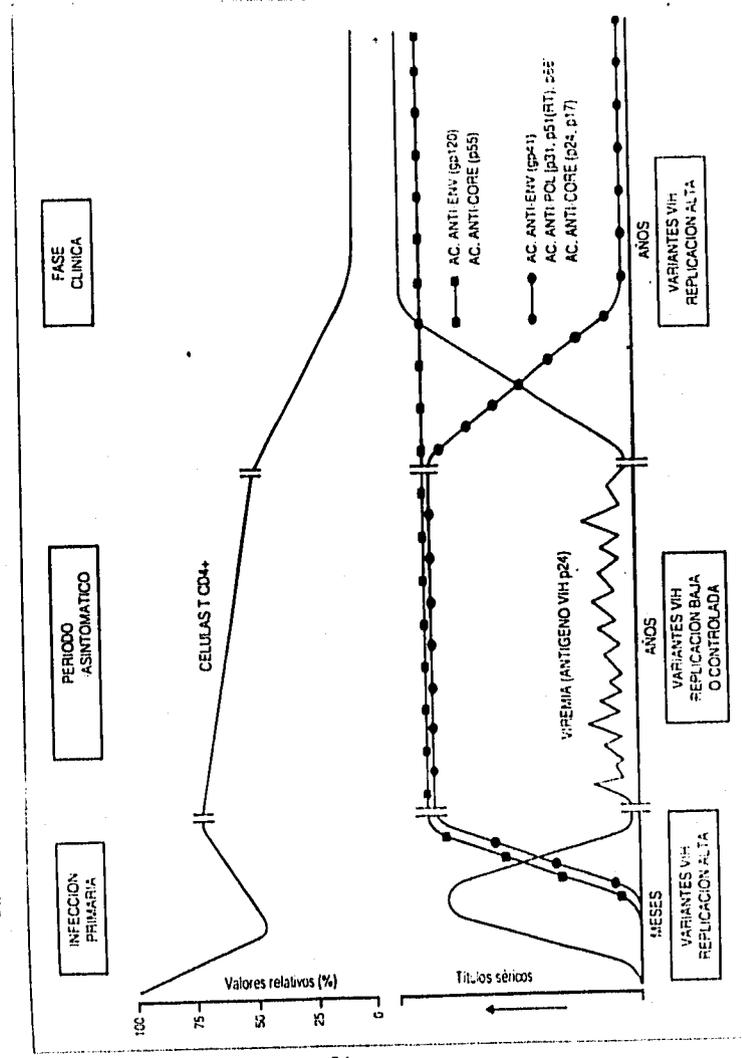
Estos marcadores reflejan de forma directa o indirecta la acción que ejerce el VIH sobre el sistema inmunológico del paciente, y se han utilizado independientemente o combinados. Así, la progresión a SIDA a los 3 años se produce en el 99% de los casos si la B2-microglobulina es mayor de 5 g/ml, el antígeno p24 es positivo y los linfocitos CD4 son inferiores a 200 células/mm³. (2)

2.6.4 SIDA PEDIÁTRICO

Las principales vías de contagio son los hemoderivados y la vía materno-fetal. La infección durante el parto es posible, pero no parece muy frecuente. No hay datos que sugieran la indicación de cesárea como medida preventiva. La tasa de transmisión de la infección vía vertical se estima en un 15-20%. El deterioro del estadio clínico y un número bajo de linfocitos CD4 de la madre condicionan un mayor riesgo de contagio. Por otro lado, la presencia de anticuerpos frente a la gp120 en la madre se ha asociado con menor transmisión.

FIGURA 4

PATRONES DE EVOLUCION, A LO LARGO DE LA INFECCION VIH, DE LA ANTIGENEMIA P24, DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A DIFERENTES PROTEINAS DE VIH.



También existe la posibilidad de contagio a través de la leche materna. No existen pruebas de que contactos casuales o incluso el contacto habitual intrafamiliar sean vías de transmisión de la infección. Tampoco tienen riesgo de contagio los compañeros de colegio de los niños infectados (2)

DEFINICION DEL CDC DE LA INFECCION POR VIH EN NIÑOS.

Los niños menores de 18 meses con infección perinatal, deben presentar:

- VIH en sangre o tejidos, o
- Síntomas que cumplan la definición de caso de SIDA para el CDC, o
- Anticuerpos anti-VIH y signos de inmunodeficiencia humoral y celular y síntomas.

Los niños con infección perinatal de más edad o los que han adquirido la infección a través de otra vía de transmisión deben presentar:

- VIH en sangre, o
- Anticuerpos anti-VIH con/sin alteración inmunológica, o
- Síntomas que cumplan la definición de caso de SIDA del CDC. (2)

MANIFESTACIONES.

No se conoce con exactitud el período de incubación, aunque se sabe que es más corto en niños infectados por vía vertical, y más corto en niños que en adultos. Las manifestaciones inespecíficas se definen como 2 de los siguientes hallazgos persistentes durante al menos 2 meses: fiebre, retraso de la estatura y peso o pérdida de más del 10% del peso, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía generalizada, infiltración parotídea y diarrea persistente o recurrente. (2)

2.7 DIAGNOSTICO.

La especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo han sido empleadas para el desarrollo de diferentes procesos que reciben el nombre de "Inmunoensayos".

En estos procesos se utilizan antígenos, haptenos o anticuerpos para la identificación o cuantificación de moléculas de interés en el laboratorio clínico. El análisis inmunoenzimático se fundamenta en la propiedad de las enzimas de ser conjugadas o unidas a anticuerpos o haptenos en forma covalente, sin que el conjugado resultante (Ag-enzima, Ac-enzima) pierda sus características de reactividad inmunológica o enzimática, la característica de las enzimas para catalizar la conversión de un gran número de moléculas de sustrato, proporciona la base para amplificar y detectar indirectamente una reacción Ag-Ac. Así mismo en casi todos estos sistemas la acción de la enzima sobre los sustratos genera productos coloridos, lo que permite la realización de pruebas cualitativas interpretadas por la intensidad en el color desarrollado y de pruebas cuantitativas utilizando un colorímetro o espectrofotómetro (47).

La infección por VIH puede ser identificada en el laboratorio de diferentes formas:

Metodos Indirectos:

- Determinación de anticuerpos anti-VIH
- Identificación de proteínas virales.

Métodos Directos:

- Determinación de antígenos virales.
- Cultivo de virus
- Identificación del ADN viral mediante técnicas como la PCR

DETECCION DE ANTICUERPOS

2.7.1 PRUEBA DE AGLUTINACION DE PARTICULAS (SERODIA VIH)

Esta prueba utiliza antígeno de VIH obtenido por el cultivo del virus en células linfoides (H9/ITLV-III). El virus es inactivado y desintegrado y con él se cubren partículas que pueden ser eritrocitos, gelatinas o látex. La prueba se basa en la aglutinación producida por la reacción antígeno-anticuerpo que se presenta cuando el suero que se está probando contiene anticuerpos específicos dirigidos a los antígenos virales que recubren las partículas. La reacción es evaluada visualmente. Se observa la diferencia entre la reacción negativa que produce un botón compacto y la positiva en el asentamiento de las partículas.

2.7.2 APLICACIONES DE LA TECNICA ELISA PARA EL SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA. DIAGNOSTICO INDIRECTO.

Para el diagnóstico serológico del VIH existen pruebas de tamizaje y de confirmación, las primeras se basan en métodos inmunoenzimáticos o de aglutinación, la fase sólida esta recubierta con el antígeno del virus del VIH obtenido de la línea celular H-9 en el análisis inmunoenzimático este virus es aislado, inactivado por ultrasonido y detergentes.(Primera generación) o a través de ingeniería genética por DNA recombinante de E.coli (segunda generación). En esta fase sólida se incuba el suero o el plasma junto con el diluyente, si existe la presencia del anticuerpo, se dará la reacción antígeno-anticuerpo adicionando el anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa, que se unirá si existe la reacción detectándose un color amarillo-anaranjado, el cual es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el VIH que se unió a la fase sólida. Los ensayos de primera generación pueden dar falsos-positivos cuando

existen anticuerpos a los complejos del sistema HLA al DR4, en los métodos de segunda generación esto se elimina dada la obtención del antígeno, los métodos de tercera generación utilizan diferentes modelos sintéticos de péptidos para una variedad de proteínas virales.

Los antígenos producidos por técnicas de recombinación del DNA y por ensamblaje sintético de péptidos ofrecen ventajas de mayor sensibilidad y especificidad sobre las proteínas derivadas del virus. Los nuevos avances en materia de reactivos, que incluyen pruebas diagnósticas autorizadas por la FDA se han dirigido hacia las proteínas p24, p31, gp41 y gp120/160. Se han propuesto las tiras de nitrocelulosa con bandas separadas de estos cuatro principales antígenos para sustituir al lisado de VIH-Western blot. Para los análisis con antígeno derivado de productos de genes únicos, se han elaborado proteínas de envoltura gp41 y gp120/160. Estas series de reactivos, denominadas de segunda y tercera generación, ofrecen ventajas significativas sobre los reactivos de lisado estándar (OMS, 1989).

Las proteínas recombinantes y los conjuntos de péptidos sintéticos se hallan en forma muy pura, por lo que los reactivos de prueba son más constantes de un lote a otro. (47)

Las técnicas de ELISA son muy sensibles (99.84%) sin embargo el porcentaje de "falsos positivos" se incrementa con la sensibilidad. Un resultado positivo no es sinónimo de enfermedad debiéndose realizar pruebas confirmativas (56).

2.8 PRUEBA CONFIRMATORIA: ENSAYO CUALITATIVO PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS AL VIH.

TÉCNICA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

En este método el virus es purificado y separado en las partes que lo componen, por tratamiento con el detergente SDS (dodecil sulfato de sodio) y éste es separado en un gel de poliacrilamida por electroforesis de acuerdo a su peso molecular. Las proteínas son transferidas del gel al papel de nitrocelulosa que se corta en tiras, el ensayo se realiza como una ELISA indirecta con estas tiras y como resultado se forman bandas coloridas.

En 1990 se establece que: las diferentes alternativas para el criterio de valoración en la técnica de Western blot para los diferentes grupos son: para la Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors and AIDS Program proponen como resultado positivo ante la presencia de solamente dos bandas que pueden ser p24, gp41 y gp120, gp 160 (ASTPHLD). Para The Consortium for retrovirus Serology Standardization (CRSS) define como positivo ante la presencia de otras bandas con p24 o p31, y de el gen "ENV" deben estar presentes gp41, gp120, gp160.

Para The American Red Cross define como positivo la presencia de una o más bandas de los genes gag, pol y env. Para estos tres grupos y para la casa comercial Du Pont sugieren para el criterio de indeterminados la presencia de otras bandas o estas mismas, siempre y cuando no se presenten en alguna forma de los criterios que se dieron para establecer una positividad. Un resultado negativo es ante la ausencia de todas las bandas. (29)

Solamente el ensayo comercial de Western blot de Du Pont tiene la licencia de la Food and Drug Administration (FDA) para usar estos criterios en el diagnóstico de infección de VIH-1 (56).

A) El resultado es positivo ante la presencia de las bandas de precipitación p24, p17, p41, gp120. El resultado es indeterminado ante la presencia de cualquier banda sin estar presentes p24 y p41, según el criterio de la CDC (Centers for Disease Control).

B) El resultado es positivo ante la presencia de las proteínas, una del core (corazón), una de env (envoltura) y una de la transcriptasa reversa, el resultado es indeterminado ante la presencia de dos bandas de precipitación: una de core y env, una de core y TR (Transcriptasa reversa) una de env y TR, nunca la presencia de las tres (core, env y TR) según el criterio de la OMS (Organización Mundial de la Salud).

Las bandas de precipitación no específicas pueden ser resultado de una infección temprana o un resultado indeterminado; reacción cruzada con anticuerpos como el VIH-2 o por diferentes retrovirus endógenos o los similares a complejos relacionados al SIDA (25,56).

2.9 INDETERMINADOS AL VIH

En la realización de las pruebas confirmatorias para la detección de los anticuerpos contra el VIH, a través del análisis de inmunoelectrotransferencia Western blot, se ha considerado la existencia de patrones de reactividad indeterminada y que de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud, publicados en 1990, los define como aquellos casos cuando no se presentan dos bandas de glicoproteína "gp" de la envoltura del virus, como son gp41, gp120, gp160; con cualquiera del gen "gag" pudiendo ser p55, p24, p17 o del gen "pol" v.gr. retrotranscriptasa p31, p51, p66.

Para poder establecer el criterio de un resultado indeterminado se pueden observar las siguientes combinaciones (OMS)

- a.-Una banda del gen "env", acompañada con alguna del gen "gag" o "pol"
- b.-Una banda del gen "gag" y
- c.-Una banda del gen "pol".

Se ha referido que en poblaciones de donadores de sangre el porcentaje de sujetos con resultados indeterminados puede ser hasta del 20% con presencia de las proteínas p24 y p55, correspondiendo estos datos a la población de bajo riesgo para la infección por VIH. Asimismo, se ha encontrado que puede tratarse de una seroconversión en algunos donadores con patrón indeterminado ante la presencia de la banda de la gp160. (55).

Se han referido diferentes posibilidades dentro del patrón indeterminado, como son: hábitos sexuales, costumbres sociales, convivencia con animales, reacción cruzada con algún otro retrovirus así como su relación con el sistema HLA (antígenos leucocitarios humanos). Un factor importante en los donadores con patrón indeterminado, es el comprobar por medio de pruebas, una posible reacción cruzada con los siguientes retrovirus: HTLV-I, HTLV-II y VIH-2. Pero esto no ha sido bien fundamentado. Sin embargo, la posibilidad de una reacción cruzada se ve influenciada por la presencia de ciertas bandas de proteínas que pertenecen en común a estos retrovirus (p26/53) (55).

Se ha descartado cualquier analogía del HTLV-II con el VIH. Las bandas del VIH-2 son similares al VIH-1. Se han identificado las siguientes proteínas del VIH-2: p18, p26, gp32, que son comparables con p17, p24 y gp41 del VIH-1 (52).

Los donadores con Western blot VIH-2 positivos, presentan las siguientes bandas: p26, p55,

gp32, la región de la gp32 del VIH-2 es similar a la gp41 del VIH-1 aunque esto no sucede siempre.

Se ha demostrado que en los donadores de sangre con patrón indeterminado, suelen presentarse diferentes aspectos asociados a las reacciones cruzadas con el VIH-1. Estos aspectos son:

-Algunos de éstos donadores presentan un agotamiento de los linfocitos-T, disminución de la citotoxicidad mediada por complemento de células mononucleares.

-La presencia de anticuerpos hacia los antígenos de clase II del sistema HLA, u otros linfocitos o monocitos.

-Hay aloinmunización por transfusiones preliminares, reacción cruzada por la presencia de anticuerpos.

-La presencia de factor reumatoide (55).

No se descarta la posibilidad de reacciones cruzadas con el virus de la leucemia bovina (BLV) y con el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), se habla de una posible reacción cruzada de los antígenos del "core" del BLV y el HTLV-I, la posibilidad de una reacción del VIH con el BLV no se ha comprobado experimentalmente al igual que el VIH con BIV.

Muchos de los estudios con resultados indeterminados, han presentado positividad para el HTLV-I y HTLV-II, éstos pacientes tienen documentada la infección con la clínica del HTLV-I y HTLV-II. En nuestro medio se tienen evidencias de reacción cruzada con el VIH-2 o con el HTLV-I, sin embargo, dicha reacción cruzada está reportada en la literatura. La existencia de anticuerpos anti-HLA, particularmente en el grupo de sujetos multitransfundidos, puede explicar los patrones de un Western blot con resultados indeterminados (42).

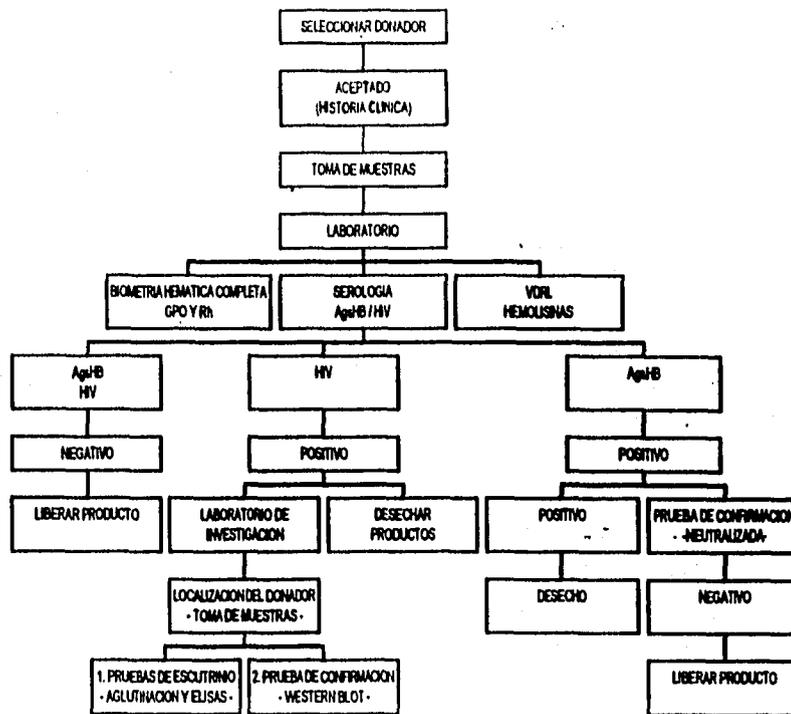
La falta de reactividad para los antígenos VIH no recombinantes sugiere la no especificidad de

éstos productos, ya que puede deberse a una contaminación de lisados virales usados en el ensayo de Western blot o bien materiales adicionales usados en el procedimiento. Se deben de excluir las unidades de sangre con resultados positivos en las técnicas de ELISA y Western blot indeterminado. Es importante el seguimiento de éstos donadores por algún tiempo, ya que ellos no presentan inicialmente todas las bandas en el Western blot, por lo cual se debe de mostrar, mediante otros métodos, la evidencia de la infección del VIH. En dichos donadores de sangre, es alta la probabilidad de que los patrones del Western blot indeterminados representen una reacción cruzada no específica, que en cualquier momento el donador pueda volverse un factor de riesgo de infección para el VIH-1. El significado de estos datos no se ha comprobado experimentalmente, el estudio de patrones indeterminados en el Western blot es difícil de fundamentar (55).

CAPITULO III.

PARTE EXPERIMENTAL

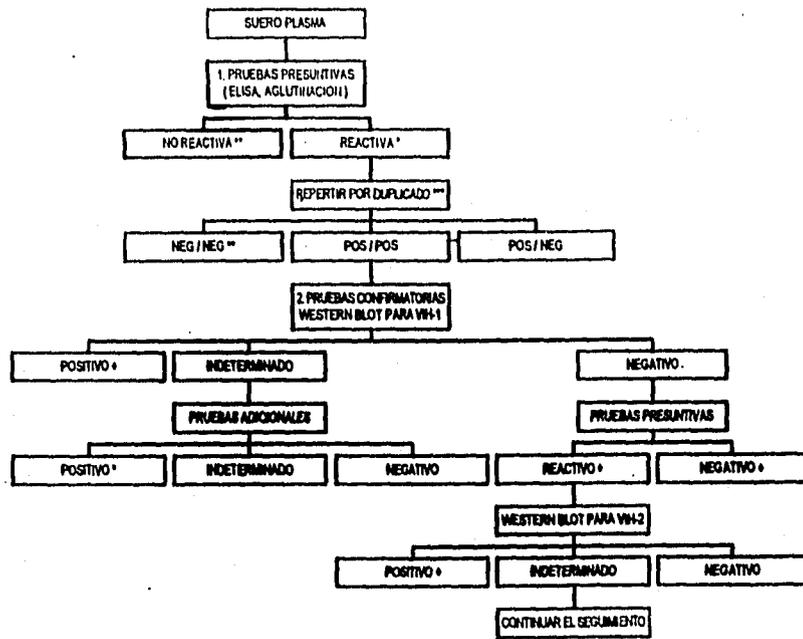
3.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL.



CONTINUACION DEL DIAGRAMA EXPERIMENTAL

1.- PRUEBAS DE ESCRUTINIO

2.- PRUEBAS DE CONFIRMACION



- * Se usa el termino "reactivo" cuando se trata de pruebas presuntivas y positivo para el caso de pruebas confirmatorias.
- ** Informar el resultado como Negativo.
- *** Cuando se trata de la oncas del mismo formato.
- Informar este resultado.

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Sueros y Plasmas de donadores de sangre altruistas del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea; los cuales fueron previamente informados sobre los requisitos para poder ser donadores de sangre, según la norma técnica No.277 de la Secretaría de Salud.

-Ayuno.

-Edad 18-65 años.

-Pesar más de 50 Kgs.

-Someterse a los exámenes clínicos y de laboratorio para descartar enfermedades transmitibles.

EXCLUSIÓN DE DONADORES

SI HAN PADECIDO

-Hepatitis, sífilis, cáncer, diabetes, epilepsia, hipertensión arterial, gota, tuberculosis, enfermedad de riñón o corazón.

-Alergias a alimentos o medicamentos.

-Cirugía mayor hace 6 meses.

-Embarazo o haber estado embarazada en el último año.

-Período menstrual.

-Lactancia.

SI HAN RECIBIDO

-Medicamentos en las últimas 72 horas.

-Vacuna contra la rabia o contra la hepatitis en el último año.

-Vacuna en los últimos 6 meses.

-Acupuntura o Tatuaje en el último año (14).

3.2.1 MATERIAL DE LABORATORIO

- Gotero de aproximadamente 25 µl, 2 piezas (Laboratorios MILES).

- Micropipetas automáticas, con puntas desechables, de 25 y 50 µl.

- Pipetas volumétricas de 1.0, 5.0, y 10.0 ml.

- Pipetor multicanal con capacidad de adicionar volúmenes de 50, 100, y 200 µl, con puntas desechables.

- Micropipetor con capacidad de adicionar volúmenes de 10 hasta 1,000 µl, con puntas desechables

- Papel absorbente desechable.

- Recipiente para reactivo (vidrio y/o plástico) con capacidad de 25 ml.

- Tubos de ensayo de polipropileno con portatubos de identificación (Laboratorios ABBOTT).

- Folios adhesivos (Laboratorios ABBOTT)

- Micropipetas para suministrar volúmenes de 10, 200, 300, 400 y 1,000 µl, con puntas desechables

- Distribuidor de microesferas (Laboratorios ABBOTT).

- Pipeta multicanal de Organon Teknika o sistema equivalente con puntas desechables para 100µl

las pipetas no deben tener partes metálicas

- Placa para incubación de 25-30 pozos. (Laboratorios DuPont).

3.3 METODOLOGIAS

3.3.1 SERODIA-VIII.

EQUIPO:

American Rotator. Mfd by American Dade.

FUNDAMENTO:

El componente de un reactivo de SERODIA-HIV es de partículas de gelatina sensibilizadas con antígeno de HIV inactivado (Virus de Inmunodeficiencia Humana) el cual ha sido procesado por rompimiento, con detergente, de un cultivo puro de HIV*. Como una prueba de aglutinación el principio de SERODIA-HIV se basa en que estas partículas sensibilizadas son aglutinadas por la presencia de anticuerpos de HIV en muestras de suero o plasma.

* Este HIV fue preparado por concentración de un cultivo líquido de la producción de virus en una línea celular, utilizando la centrifugación en gradiente de sacarosa y colectando la fracción del virus correspondiente a una densidad cercana a 1.16 Kg/cm^3 .

TRABAJOS PREVIOS

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso (15-30°C).

Lavar la microplaca antes de su uso según indicaciones del fabricante.

Reconstituir los liofilizados 30 min. antes de la prueba como se indica:

a) Para reconstituir las partículas sensibilizadas adicione 3.5 ml de solución reconstituyente al frasco ampula.

b) Para reconstituir las partículas no-sensibilizadas adicione 2.0 ml de solución reconstituyente al frasco ampula.

Preparación de las muestras.

Para evitar interferencia en los resultados, separar los eritrocitos u otras partículas suspendidas en las muestras mediante centrifugación; las muestras a estudiar no deben estar contaminadas, ni lipémicas, ni hemolizadas, si es necesario la muestra deberá filtrarse.

TECNICA

1.- Colocar tres gotas (75 μ l) del diluyente de suero en el pocillo No.1 y una gota (25 μ l) en los pocillos 2 y 3 utilizando el gotero que proporciona el estuche.

2.- Agregar 25 μ l del suero de la muestra en el pocillo No.1 utilizando una micropipeta y mezclar llenando y descargando la micropipeta, de 3 a 4 veces. Tomar 25 μ l de la solución del pocillo No.1 y transferir al pocillo No.2, mezclar en el pocillo No.2 y transferir al pocillo No.3, para obtener una segunda dilución.

3.- Colocar una gota (25 μ l) de partículas NO sensibilizadas en el pocillo No.2 y una gota (25 μ l) de partículas sensibilizadas en el pocillo No.3, utilizando los goteros del estuche.

4.- Mezclar el contenido de los pocillos perfectamente utilizando un mezclador de charola), cubrir la placa, colocar en una superficie plana y nivelada, dejar que permanezca así a temperatura ambiente

(15-25°C) durante 2 horas, leer los resultados.

VALIDACION

PRUEBAS CONTROL

- 1.- Confirmar que la reacción de cada muestra y las partículas NO sensibilizadas (dilución final 1:16) sea negativo.
- 2.- La mezcla del diluyente del suero ya sea con partículas sensibilizadas o NO sensibilizadas no debe dar ninguna reacción negativa para cada corrida (control del reactivo).
- 3.- Confirmar que el título del suero control positivo sea 1:128 en la dilución final, cuando realice el procedimiento de prueba para que haya consistencia de lote a lote.

INTERPRETACION.

Colocar con cuidado la microplaca sobre una superficie plana, comparar los patrones negativos de aglutinación con aquéllos del control positivo e interpretar de acuerdo con los criterios mostrados en la Tabla A.

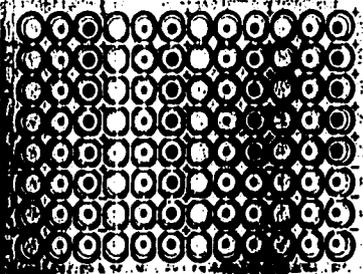
En la ejecución de la prueba una muestra que presenta una reacción negativa con partículas no-sensibilizadas (dilución final de suero 1:16) pero muestra aglutinación con partículas sensibilizadas (dilución final de suero 1:32 o más) es considerada como reacción positiva.

INTERPRETACION DE LA PRUEBA DE AGLUTINACION

(SERODIA - - VIII)

Patrones de aglutinación

Patrones de aglutinación
Patrones de aglutinación
Patrones de aglutinación
Patrones de aglutinación
Patrones de aglutinación
Patrones de aglutinación



Colocar la policubeta en este marco y hacer fotografías. Comparado con los patrones de aglutinación de las fotografías.

Patrones de aglutinación



TABLA "A"

PATRONES DE AGLUTINACION	LECTURA	INTERPRETACION
Partículas concentradas en forma de precipitado en el centro del pocillo con un margen exterior redondo tenue.	(-)	NEGATIVO
Partículas concentradas en forma de un anillo compacto con un margen exterior redondo tenue.	(+/-) **	NEGATIVO
Anillo definido, grande, un margen exterior rugoso multiforme y aglutinación periférica.	(+)	POSITIVO
Partículas aglutinadas, opacas expandidas cubriendo el fondo del pocillo en forma uniforme.	(++)	POSITIVO

**** Interpretar como negativo la muestra que da un resultado (+/-). Para obtener una lectura adecuada, correr una prueba de confirmación con la muestra en lugar del control positivo (Ver esquema de la Tabla "A").**

PROCEDIMIENTO DE ABSORCION.

Si la muestra ocasiona la aglutinación con partículas sensibilizadas y NO sensibilizadas, volver a probar después del siguiente procedimiento de absorción.

- 1.- Colocar una gota (25 µl) del diluyente de suero en el pocillo No.3 de una microplaca.
- 2.- Colocar 0.35 ml de las partículas NO sensibilizadas reconstituidas en un pequeño tubo de ensayo.
- 3.- Agregar 0.05 ml de la muestra en el tubo de ensayo, mezclar perfectamente e incubar a temperatura ambiente (15-25°C) durante 20 minutos (mezclar bien, agitando manualmente 1 ó 2 veces durante la incubación).
- 4.- Centrifugar durante 5 minutos a 2,000 rpm. separar y tomar el sobrenadante (dilución del suero 1:8 absorbido) con mucho cuidado colocar 50 µl en el pocillo No. 2 de la microplaca.
- 5.- Mezclar llenando y descargando la micropipeta con 25µl de la solución diluida en el pocillo No.2 y transferir al pocillo No.3, repetir este procedimiento en el pocillo No.3 para lograr una segunda dilución.
- 6.- Después, seguir el mismo procedimiento que para el ensayo de prueba y leer los resultados

3.3.2 DU PONT VIII-1 ELISA

EQUIPOS

Automatic or Manual Microplate Washer. Du Pont Company.

Microplate Reader. Con capacidad para trabajar con longitud de onda de 405-410 nm. Du Pont Company.

FUNDAMENTO

Esta prueba utiliza antígenos de HIV obtenidos a partir de cultivo de virus en células linfoides de la línea H-9/HTLV-III_B.

El virus aislado es inactivado por tratamiento con psoralen, luz ultravioleta y detergentes para una separación, seguida del revestimiento de los pozos de la microplaca. El diluyente de las muestras y los controles son adicionados a los pozos. Durante la incubación los anticuerpos del HIV-1 presentes en las muestras se unirán a los antígenos virales adheridos a los pozos de la microplaca, la placa es lavada para eliminar todo el material que no se unió. El conjugado (anticuerpos anti-IgG humanos obtenidos de cabra unidos a fosfatasa alcalina) se adiciona a cada pozo de reacción. Este conjugado se une al complejo antígeno-anticuerpo, después de la incubación la placa es lavada y se elimina el exceso de conjugado, el sustrato (para-nitrofenilfosfato) es adicionado a los pozos, después de una incubación se le agrega hidróxido de sodio a la placa para detener la reacción enzima-sustrato. El color amarillo que se produce se lee por medio de un espectrofotómetro, y es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra.

TRABAJOS PREVIOS:

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (15-30°C) aproximadamente 30 minutos antes de su uso.

TECNICA:

Sacar la microplaca de la bolsa de plástico. Adicionar muestras y controles a la microplaca usando un pipetor/dilutor, para la adición de muestras directamente; o un pipetor manual para la adición de muestras preparadas.

ADICION DE MUESTRAS PREPARADAS.

A.- Adicionar 300 μ l de diluyente a tubos de polipropileno o similar.

B.- Adicionar 15 μ l de muestra y controles a los tubos con diluyente, mezclar perfectamente.

C.- Designar 2 pozos como BLANCO. NO ADICIONAR MUESTRA EN ESTOS POZOS.

Adicionar 200 μ l de diluyente a cada uno de estos pozos.

D.- Designar 2 pozos para el control Negativo y 4 pozos para el control Positivo .

E.- Transferir 200 μ l de muestra y control a los pozos correspondientes de la microplaca, al igual que los controles.

METODOLOGIA:

1.- Tapar con papel adhesivo perfectamente la placa, agitar por 5-10 segundos para remover las burbujas de aire que estuvieran atrapadas.

2.- Incubar la microplaca por 60 minutos +/-5; a 37°C.

3.- Preparar la solución del conjugado.

4.- Sacar la placa de la incubadora firmemente tomada por las orillas, destapar removiendo el adhesivo y desecharlo.

5.- Lavar la microplaca con el concentrado de lavado diluido:

I.- LAVADO DE LA MICROPLACA AUTOMATICO. Usar 2-3 ciclos de lavado, entre cada ciclo invertir la placa sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de agua.

II.- LAVADO DE LA MICROPLACA MANUAL. Lavar 6 ciclos usando de 275-300 μ l por pozo, en cada ciclo, aspirar el agua de los pozos en el mismo orden, aspirar después de cada ciclo.

6.- Después de cada lavado, tomar firmemente la placa de la base e invertirla sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de agua.

7.- Preparar previamente la solución del conjugado, usar una pipeta multicanal para adicionar 100 μ l de conjugado a los pozos de la microplaca. Aplicar un papel adhesivo como en el paso 1.

8.- Incubar 30 minutos \pm 5 a 37°C.

9.- Preparar la solución de sustrato durante los 5-10 minutos antes del término del periodo de incubación del conjugado.

10.- Destapar, removiendo el adhesivo como en el paso 4, repetir los lavados como en el paso 5 y 6.

11.- Usar un pipetor multicanal para adicionar 200 μ l de sustrato a los pozos de la microplaca y posteriormente repetir el paso 1.

12.- Incubar la microplaca por 30 minutos \pm 1 a 37°C.

13.- Repetir el paso 4.

14.- Adicionar con un pipetor multicanal 50 μ l de solución de detenimiento a cada pozo de la microplaca.

Determinar la absorbancia de cada pozo, utilizando una longitud de onda de 405-410 nm del espectrofotómetro o bien en un colorímetro, la referencia va de 620-630 nm.

La absorbancia se leerá dentro de las dos horas siguientes a la adición de la solución de detenimiento.

VALIDACION:

CALCULO DE LOS VALORES DE CONTROL Y MUESTRAS.

1.- **BLANCOS.** La lectura de absorbancia de los blancos debe ser inferior o igual a 0.200, la lectura que no entre en este rango deberá repetirse.

2.- **CONTROL NEGATIVO.**

A.- Calcular la absorbancia una vez aceptados los valores de los blancos.

B.- La absorbancia de los controles negativos debe ser menor o igual a 0.000, los valores mayor o igual a 0.250 son valores fuera de rango y debe repetirse la muestra.

C.- La suma de los valores de absorción obtenidos, aceptables se divide por el número total de valores para obtener el resultado del control negativo.

3.- **CONTROL POSITIVO.**

A.- La absorbancia de los controles positivos debe ser menor o igual a 0.500, los valores mayor o igual a 2.000; son valores fuera de rango y debe repetirse la prueba.

B.- La suma de los valores de absorción de los controles positivos se divide por el número total de controles para obtener el resultado del control positivo.

C.- Todos los controles positivos con un valor de extinción de +/- 30% del valor total del control positivo son aceptados, se descartan los valores fuera de este rango.

CALCULO DEL PUNTO DE CORTE:

CALCULO DE LA PROPORCION DE CONTROL NEGATIVO Y POSITIVO.

A.- Dividir el valor del control negativo entre el valor del control positivo.

B.- Este valor obtenido debe ser menor o igual a 0.200. Si la proporción es mayor o igual a 0.200 todas las muestras deben ser repetidas.

Multiplicar la media del control positivo por 0.50 para obtener el valor del punto de corte.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

Muestras con valores de absorción menores al valor del punto de corte son consideradas no reactivas por el criterio de Du Pont HIV-1 ELISA, y se interpretan como negativas.

Muestras con valores de absorción mayores

Especímenes con valores de absorción mayores o iguales al valor del punto de corte se consideran inicialmente reactivos por el criterio de Du Pont, pero antes de la interpretación final de la muestra, debe repetirse por duplicado, si el resultado de esta muestra es reactivo (positivo) el espécimen es considerado reactivo repetidamente.

Los especímenes inicialmente reactivos que no reaccionaron al ser trabajados por duplicado son considerados negativos a anticuerpos a VIH-1.

Los especímenes que son repetidamente reactivos tienen la probabilidad de que los anticuerpos VIH-1 se encuentren presentes, especialmente en especímenes obtenidos de pacientes de alto riesgo para la infección de VIH-1.

3.3.3 ABBOTT HIV-1 EIA-RECOMBINANTE.

EQUIPO.

Sample Management Center. COMMANDER. ABBOTT Laboratories.

Parallel Processing Center. COMMANDER. ABBOTT Laboratories.

Dynamic Incubator. ABBOTT Laboratories.

FUNDAMENTO.

El ABBOTT HIV 1 EIA RECOMBINANTE utiliza un sistema de detección en el cual las esferas son recubiertas de antígenos HIV 1 CORE y ENV, derivados del DNA recombinante. Las esferas recubiertas se incuban con un diluyente de muestras y con suero o plasma humano, y con los controles apropiados. Los anticuerpos contra los antígenos HIV 1 CORE y ENV, presentes en la muestra, se unen a los antígenos HIV 1 de la fase sólida. Después de la aspiración del material no unido y del lavado de la esfera, se incuba el complejo antígeno-anticuerpo de la esfera con anticuerpo anti-IgG humana de cabra, conjugado a peroxidasa de rábano picante (anti-IgG humana: HRPO). El conjugado enzimático no unido se aspira y las esferas se lavan. A continuación se agrega una solución de o-fenilendiamina (OPD) que contiene peróxido de hidrógeno a las esferas. La reacción de la solución de sustrato OPD con la HRPO produce un color amarillo-anaranjado, cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-HIV 1 presentes en la muestra. La reacción enzimática se suspende agregando ácido sulfúrico 1 N, y la intensidad de color formado se mide usando un espectrofotómetro ajustado a 492 nm.

TRABAJO PREVIO A LA TECNICA.

- 1.-No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- 2.-No mezclar reactivos de lotes diferentes.
- 3.-No exponer los reactivos de OPD a la luz fuerte durante la incubación.
- 4.-Llevar todos los reactivos a la temperatura ambiente (15 a 30°C) para el uso.

TECNICA

PRIMERA INCUBACION.

- 1.- Distribuir 10 µl de cada control o muestra en el fondo de las cavidades de la placa de reacción, 2 controles negativos, y 3 controles positivos.
- 2.- Distribuir 400 µl del diluyente de muestras en cada cavidad que contiene un control o una muestra.

DILUCION / DISTRIBUCION AUTOMATICA.

- 1.- Aspirar 10 µl de muestra o control y distribuirlo junto con 400 µl de diluyente de muestra dentro de las cavidades correspondientes.
- 2.- Añadir cuidadosamente una esfera en cada cavidad que contiene un control o una muestra.
- 3.- Cubrir con un folio adhesivo. Agitar vigorosamente la placa para mezclar muestras y esferas y para eliminar burbujas de aire atrapadas.
- 4.- Incubar a 40 +/-2°C durante 30 minutos.
- 5.- Retirar el folio adhesivo y desecharlo. Aspirar el líquido y lavar cada esfera tres veces con 4-6 ml de agua destilada o desionizada, para completar un volumen total de lavado de 12 a 18 ml.

SEGUNDA INCUBACION

- 6.- Pipetear 200 μ l de conjugado diluido en cada cavidad que contiene una esfera.
- 7.- Cubrir con un nuevo folio adhesivo. Golpear la placa para que el líquido cubra las esferas y para eliminar burbujas de aire que hayan quedado atrapadas.
- 8.- Incubar a 40 \pm 2°C durante 30 minutos.
- 9.- Retirar el folio adhesivo y desechar. Aspirar el líquido y lavar cada esfera tres veces como en la primera incubación.

DESARROLLO DE COLOR.

- 10.- Pipetear 300 μ l de solución de sustrato OPD recién preparada, a cada uno de los pozos que contienen una esfera.

NOTA: Si se ocupa un distribuidor automático, purgar antes de suministrar el reactivo.

- 12.- Cubrir e incubar a temperatura ambiente durante 30 \pm 2 minutos.
- 13.- Agregar 300 μ l de solución de detenimiento a cada pozo.

VALIDACION

La solución de sustrato OPD (OPD más diluyente para OPD) debe ser incolora llegando a lo más a un color amarillo pálido. Un color amarillo-anaranjado indica que el reactivo está contaminado y debe desecharse.

Un valor inferior a 0,400 unidades de absorción para la diferencia entre los valores promedio de los controles positivos y negativos (P-N) puede indicar errores técnicos o una descomposición de los reactivos del kit o de los reactivos de OPD. En tales casos el análisis deberá repetirse.

CALCULO DEL PUNTO DE CORTE

Si se emplea el analizador COMMANDER, todos los cálculos se efectúan en forma automática.

Cálculo de la absorción promedio del control negativo (NCx)

Cálculo de la absorción promedio del control positivo (PCx)

Cálculo del Valor llmite: $NCx + (0.15 \times PCx)$

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

- 1.- Las muestras con valores de absorción inferiores al valor llmite son negativas de acuerdo a los criterios de la prueba.
- 2.- Las muestras con valores de absorción iguales o superior al valor llmite son reactivas de acuerdo a los criterios de la prueba y deberá repetirse su análisis antes de la interpretación usando la fuente original.
- 3.- Las muestras que hayan sido encontradas repetidamente reactivas se consideran positivas para el anticuerpo contra el VIH-1 de acuerdo a los criterios de la prueba.
- 4.- Las muestras inicialmente reactivas que resulten negativas después de la repetición del análisis deberán volverse a analizar por medio de la fuente original.

3.3.4 ORGANON VIRONOSTIKA ANTI-HTLV-III.

EQUIPO

Microelisa Reader or Stripreader. Organon Teknika.

Washer Microelisa. Organon Teknika.

FUNDAMENTO

El test es un enzima-inmuno análisis basado en el principio del sandwich.

Los pocillos de las tiras Microelisa de poliestireno han sido sensibilizadas con el virus T-linfotrópico humano de la subclase III purificado, lo cual constituye el antígeno en fase sólida. La muestra se incuba en dicho pocillo; si en la misma existe anti-HTLV-III, éste se ligará al antígeno en fase sólida. A continuación se añade el conjugado de inmunoglobulinas anti-humanas de cabra marcadas con peroxidasa de rábano picante (HRP).

Este anticuerpo marcado se ligará al complejo antígeno/ anticuerpo en fase sólida previamente formado. La incubación con el sustrato enzimático produce un color amarillo-anaranjado en el pocillo. Si la muestra no contiene anti-HTLV-III, los anticuerpos marcados con enzima no podrán ligarse y por tanto sólo habrá un débil desarrollo de color.

TRABAJOS PREVIOS A LA PRUEBA

Todos los componentes del kit deben atemperarse antes de ser utilizados.

Pueden formarse cristales de sal en los tampones concentrados después de almacenarse a 2-8°C.

Estos cristales deben redisolverse completamente, calentándolos a 37°C, antes de su dilución. El tampón de dilución puede contener un sedimento blanco que no afectará al resultado del test.

Diluir el tampón de fosfato concentrado al 1:25 con agua destilada. Preparar 50 ml de tampón diluido para cada tira.

Preparación del diluyente de las muestras (para 192 pruebas). Diluir 10 ml de tampón de dilución concentrado a 200 ml con agua destilada.

Reconstituir los controles, negativo, positivo débil y positivo fuerte liofilizados añadiéndoles 1 ml de diluyente de las muestras a cada vial, mezclarlos hasta su completa dilución (aproximadamente 10 minutos) y homogenizarlos.

TECNICA

DILUCION DE LAS MUESTRAS. Las muestras pueden analizarse en diluciones al 1:34 ó 1:100 por lo cual pueden utilizarse diferentes valores del Cut-off. **NO DILUIR LOS CONTROLES.**

1.- Abrir la bolsa y colocar el soporte con el número necesario de tiras de microelisa, durante el proceso, las tiras deben mantenerse en el soporte.

2.- Dilución 1:100, pipetear 100 µl de cada muestra en los pocillos.

3.- Dilución 1:34, pipetear 3 µl de cada muestra en los pocillos, añadir 100 µl de diluyente, pueden diluirse las muestras utilizando un aparato que diluya y dispense automáticamente, dejar que dispense a poca velocidad para prevenir salpicadura.

4.- Controles, pipetear los controles después de las muestras, si se utiliza una tira:

- Incluir un control Negativo, 100 µl en el pocillo A1; y un control Positivo débil, 100 µl en el pocillo

A2. Si se utilizan más tiras:

- Incluir 2 ó más controles Negativos (100 µl en cada uno A1,B1..) y 2 o más controles Positivo débil (100 µl en cada uno A2,B2..) para cada soporte, si se desea, se puede incluir en cada soporte un control positivo fuerte.

5.- Cubrir las tiras con un nuevo adhesivo e incubar 30 minutos a 37°C.

6.- Lavar cada pocillo 4 veces.

7.- Durante los pasos 5 y 6. Abrir el número necesario de viales de conjugado liofilizado, un vial es suficiente para 4 tiras, añadir 5.5 ml de diluyente a cada vial y a continuación mezclar y dejar disolver por completo (unos 10 minutos) y homogeneizar. Mezclar los contenidos cuando se use más de un vial. Pipetear 100 µl de solución de conjugado a cada pocillo.

8.- Precintar las tiras con un nuevo adhesivo e incubar 30 minutos a 37°C.

9.- Lavar cada pocillo 4 veces.

10.- Pipetear 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo.

11.- Incubar 30 minutos a 20-25°C en la oscuridad.

12.- Parar la reacción añadiendo 100µl de ácido sulfúrico 2 mol/l (4N) a cada pocillo.

Alternativamente se puede usar 100µl, 1 mol/l (2N) de ácido sulfúrico para detener la reacción.

13.- Lectura fotométrica.

-Hacer una lectura blanco en el lector (de ácido sulfúrico 2N) en uno de los micropozos vacío del soporte y leer (dentro de las 2 horas siguientes al paso 12), la absorbancia de la solución de los pocillos a 492 nm.

-Lectura a simple vista. Comparar (dentro de las 2 horas siguientes al paso 12) el color de los pocillos de las muestras frente al de los pocillos control.

VALIDACION

Una serie será sólo válida si $N < 0.400$; $P - N$ IMBOLO 0.150 y menos de la mitad de los controles

negativos y positivos débiles han sido eliminados. La absorbancia del control positivo fuerte, deberá exceder con gran diferencia a la de los controles positivos débiles.

Eliminación de los valores aberrantes de los controles: Antes de determinar los resultados del test, deben ser eliminados los valores de los controles negativo y positivo débil que están fuera de rango.

Calcular la media de las absorbancias de los controles. Eliminar según la siguiente regla los controles en 4 pasos.

1. controles negativos con absorbancia $IMBOLO0.5 (N + P)$
2. controles positivos débiles con absorbancia $IMBOLO1.4 N$
3. controles positivos débiles con absorbancia $IMBOLO1.5P - 0.5N$
4. controles positivos débiles con absorbancia $<0.5 (N + P)$

CALCULO DEL PUNTO DE CORTE

El valor del punto de corte es $0.2 (4N + P)$ para las muestras diluidas al 1:100.

El valor del punto de corte es $0.5 (N + P)$ para las muestras diluidas al 1:34

Abreviaturas:

$N =$ Absorbancia media de los controles negativos.

$P =$ Absorbancia media de los controles positivos débiles.

Cálculo de los resultados. Cuando no se utiliza computador, los cálculos deben realizarse para cada soporte de tiras.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

Abreviaturas:

S = Absorbancia de las muestras.

Un test es positivo si S \geq valor del punto de corte.

Un test es negativo si S < valor del punto de corte.

Un resultado negativo indica que la muestra analizada no contiene anti-HTLV-III o al menos no contiene anti-HTLV-III en el límite de sensibilidad de Vironostika anti-HTLV-III. Un resultado positivo significa que la muestra, probablemente contiene anti-HTLV-III.

Al igual que otros inmunoanálisis, ocasionalmente pueden ocurrir reacciones falso positivas, las cuales en la mayoría de las ocasiones no son repetitivas. De ahí que se recomiende hacer una nueva determinación de todas las muestras inicialmente positivas usando una nueva y reciente preparación de las diluciones.

Un resultado repetido de positividad del anti-HTLV-III no es un diagnóstico del SIDA. Todos los datos para el diagnóstico deben basarse en los datos clínicos disponibles.

3.3.5 BEHRING ENZYGNOST ANTI-VIII MICRO.

EQUIPO

BEHRING ELISA PROCESSOR II. Manufacturer Messer Griesheim.

FUNDAMENTO

El Enzygnost Anti-HIV micro es un test inmunoenzimático basado en el principio de competición. Los anticuerpos anti-HIV de la muestra compiten con los del conjugado en los puntos de fijación del antígeno sobre la superficie de la placa de microtitulación. Cuanto más elevada sea la concentración de los anticuerpos de la muestra, menor será la cantidad del conjugado fijada. El exceso de conjugado y de elementos de la muestra no fijados, son eliminados por el lavado y finalmente se mide la actividad enzimática fijada (reacción de color azul). La transformación enzimática con los reactivos de cromógeno se interrumpe por la adición de solución de detención (reacción de color amarillo). La intensidad cromática de la reacción es inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos HIV presentes en la muestra.

TRABAJO PREVIO A LA TECNICA

Llevar todos los reactivos y las muestras a una temperatura entre 18-25°C antes de iniciar la prueba, sin sacar las placas de prueba del saco de aluminio.

Para cada placa diluir 20ml de solución de lavado de OPD con agua destilada o desionizada hasta obtener 400ml.

Para cada placa de prueba diluir 1,0 ml de cromógeno con 10,0 ml de tampón/sustrato en el frasco vacío adjunto y mantenerlo al abrigo de la luz (solución de cromógeno lista para el uso). Después de su empleo lavar el frasco cuidadosamente con agua destilada.

TECNICA

1.- Distribución de los controles y de las muestras: colocar en 4 pocillos de la placa de prueba 25 μ l de suero de control Negativo en cada uno, en 2 pocillos 25 μ l de suero control Positivo y en cada uno de los siguientes pocillos, 25 μ l de las muestras. Luego agregar 100 μ l de conjugado en cada pocillo.

2.- Incubación. Cubrir con una hoja adhesiva e incubar durante 60 +/-5 minutos a 37 +/-1°C.

3.- Lavado. Retirar la hoja adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar 4 veces con aproximadamente 0.3 ml de solución de lavado. Aspirar otra vez para eliminar los restos de la solución de lavado.

4.- Distribución del sustrato. Colocar en cada pocillo 100 μ l de la solución de cromógeno en tampón/sustrato .

5.- Incubación del sustrato. Cubrir con una nueva hoja adhesiva e incubar durante 30 +/-5 minutos entre 18-25°C al abrigo de la luz.

6.- Reacción de detenimiento. Retirar la hoja adhesiva, agregar a cada pocillo 100 μ l de solución de detenimiento manteniendo el mismo ritmo que en el punto 4.

7.- Valoración. Valorar fotométricamente a 450 nm en el término de una hora.

VALIDACION

Abreviaturas:

E - absorbancia media de los controles.

La prueba se puede valorar cuando:

E NEG \geq 0.700

E POS \leq 0.100

Si uno de los controles negativos presenta un valor de extinción inferior a 0.7 no hay que tenerlo en cuenta para el cálculo del valor medio.

Si más de 2 valores de extinción de los sueros de control se encuentran fuera de los límites de confianza indicados, hay que repetir toda la prueba.

CALCULO DEL PUNTO DE CORTE:

Para determinar el valor límite, multiplicar el valor medio de extinción del suero de control negativo por el factor 0.5.

E Neg \times 0.5 = VALOR LIMITE.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

Las muestras con un valor de extinción superior al valor límite son negativas en el Enzygnost Anti-VIII micro.

A fin de excluir un resultado falso negativo en muestras débilmente positivas, es recomendable repetir la prueba con las muestras cuyo valor de extinción está apenas por encima (aproximadamente 10%) del valor límite.

Las muestras cuya extinción es igual o inferior al valor límite deben ser consideradas provisionalmente como anti-HIV positivas y el test debe repetirse a fin de confirmar el resultado.

La repetición de las pruebas debe realizarse efectuando dobles determinaciones. Cuando el valor

medio de la doble determinación es superior al valor límite, la muestra es anti-HIV negativa. Si uno de los valores de extinción en la doble determinación se encuentra en el valor límite o por debajo de él, la prueba con el Enzygnost anti-HIV micro debe ser considerada como positiva.

3.3.6 WESTERN BLOT VIH-1.

EQUIPO.

American Rotator. Mfd. by American Dade.

Bomba de Vacío. Gast-Benton Harbor Mich. U.S.A

FUNDAMENTO

En este método el virus es purificado y separado en las partes que lo componen, por tratamiento con el detergente SDS (dodecil sulfato de sodio) y éste es separado con un gel por electroforesis de acuerdo a su peso molecular. Las proteínas son transferidas del gel al papel de nitrocelulosa se corta en tiras y el ensayo se realiza como una ELISA indirecta con estas tiras y como resultado se forman bandas coloridas.

Durante la incubación de la prueba los anticuerpos HIV presentes en la muestra se unen a los antígenos virales presentes en las tiras de nitrocelulosa, las tiras son lavadas para remover el material no adherido. Para hacer visual la unión de las inmunoglobulinas humanas específicas con las proteínas del HIV se completa con una serie de reacciones in situ con un conjugado anti-humano IgG con biotina, un conjugado de avidina con peroxidasa de rábano picante, y un sustrato de

4-cloro-1-naftol. Solamente los anticuerpos contra los antígenos HIV presentes en la muestra en suficiente concentración se harán evidentes por la presencia de una o más bandas correspondiendo a las proteínas del HIV o a sus glicoproteínas sobre las tiras de nitrocelulosa como son: p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120, gp160.

TRABAJO PREVIO A LA TECNICA:

Dejar que todos los reactivos alcancen una temperatura entre 18-25°C antes de su uso.

- 1.-Diluir la solución de amortiguador para el lavado.
- 2.-Preparar el amortiguador de trabajo.
- 3.-Preparación de la solución de conjugado No.1.
- 4.-Preparación de la solución de conjugado No.2.
- 5.-Preparación de la solución de sustrato.

TECNICA:

- 2.- Adicionar 2 ml de solución de lavado diluido a cada pozo que va a ser utilizado.
- 3.- Usando unas pinzas, remover las tiras de nitrocelulosa del vial, y depositar una en cada pozo que contiene la solución de lavado diluida.
- 4.- Incubar las tiras 30 minutos a temperatura ambiente, después remover la solución por aspiración.
- 5.- Adicionar 2 ml a cada pozo de solución de trabajo, colocar la placa en un agitador por 5-10 minutos a temperatura ambiente.

NOTA. El agitador debe tener un movimiento constante, la orientación del mezclador deberá ser a todo lo largo de la tira.

6.- Adicionar 20 µl de muestra sin diluir y de controles a cada pozo que contiene la tira asignada con la solución de trabajo .

7.- Cubrir la charola e incubar con agitación durante toda la noche a temperatura ambiente.

8.- Tener cuidado que en la agitación no se mezclen las muestras. Remover las gotas de condensación de la incubación con una toalla absorbente o con solución de lavado diluida.

9.- Aspirar la mezcla de cada pozo con una bomba que contiene desinfectante. Enjuague la punta del aspirador con solución de lavado diluida entre cada muestra para evitar contaminación.

10.- Enjuagar cada tira con 2.0 ml de solución de lavado diluida e inmediatamente remover la solución por aspiración.

11.- Lavar cada tira con 2.0 ml de solución de lavado diluida por 5 minutos después de haber aspirado la solución de lavado. Repetir una segunda vez. Todos los pasos de lavado se harán a temperatura ambiente.

12.- Adicionar 2.0 ml de solución de trabajo con el conjugado No.1 a cada pozo. Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente en agitación.

13.- Aspirar el conjugado a cada uno de los pozos. Lavar cada tira 3 veces por 5 minutos usando 2.0 ml de solución de lavado diluida en cada lavado. Aspirar la solución de cada pozo entre cada lavado.

14.- Adicionar 2.0 ml de solución de trabajo con el conjugado No.2 a cada pozo, incubar 60 minutos a temperatura ambiente con agitación.

15.- Aspirar el conjugado de cada pozo y lavar cada tira 3 veces como se indica en el paso 13.

16.- Adicionar 2.0 ml de solución de trabajo sustrato a cada pozo e incubar por 10-15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Evitar el contacto con objetos metálicos.

17.- Aspirar el sustrato y parar la reacción con varios lavados de agua destilada o desionizada.

NOTA. Algunas muestras pueden causar la formación, en la tira, de grumos de precipitación.

Las tiras pueden ser secadas con aire en cuarto oscuro y ser guardadas en bolsas de plástico.

Cuando el montaje se realiza en cintas adhesivas, la cinta no permite el desarrollo de la banda, esto puede ser la causa del desvanecimiento de la banda.

18.- Si se decide, la tira puede ser fotografiada usando una película de alta resolución. El desarrollo de la tira puede retener el color, si ha sido guardada de la luz, las exposiciones a la luz y al aire eventualmente pueden ser la causa del desvanecimiento de las bandas.

VALIDACION:

La presencia o ausencia de anticuerpos en las muestras para VIH y la identificación de estos anticuerpos es determinada por comparación de cada tira de nitrocelulosa con las tiras usadas para el control Negativo y el control Positivo débil y fuerte .

1.-Para el control negativo, ausencia de bandas visibles sobre las tiras de nitrocelulosa.

2.-Para el control positivo fuerte, todas las bandas sobre las tiras de nitrocelulosa se presentan, estas bandas son: p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66 y gp160. La presencia de la banda de la gp120

también se puede presentar pero no es un requerimiento.

3.- Para el control positivo débil, la tira de nitrocelulosa provista de menor sensibilidad exhibe las bandas p24 y gp160.

INTERPRETACION DE RESULTADOS:

La presencia y ausencia de anticuerpos al HIV en una muestra y la identificación de estos es determinada por la comparación de cada tira de nitrocelulosa con los controles. El proceso de interpretación requiere de tres pasos. Primero, cada banda es asignada por peso molecular basándose en su posición. Segundo, la reactividad de cada banda se basa en su intensidad. Y tercero cada tira se interpreta basándose en la combinación de patrones de bandas y de reactividad.

INTENSIDAD DE BANDAS**PATRON DE REACTIVIDAD**

Ausencia

(-)

Para la p24 intensidad menor que la
del control positivo débil.

(+/-)

Para la p24 una intensidad similar a la del
control positivo débil pero de menor
intensidad que el control positivo fuerte.

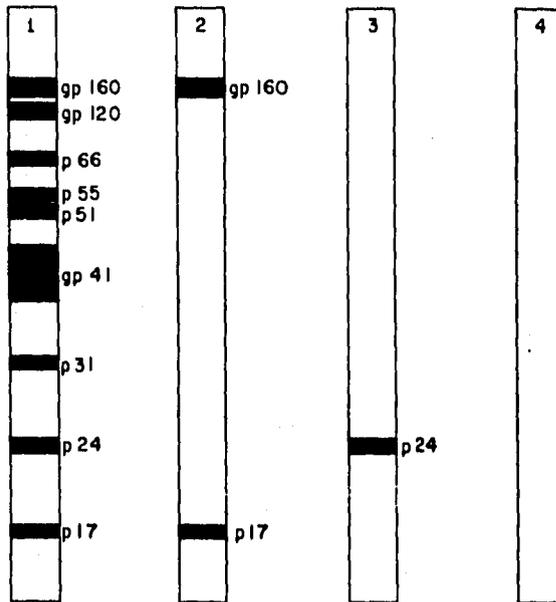
(+)

Para la p24 una intensidad igual o mayor
que la del control positivo fuerte.

(++)

Los resultados se interpretan como Negativos, Indeterminados o Positivos basándose en la presencia de patrones como sigue:

**CRITERIOS DE INTERPRETACION EN
WESTERN BLOT**



- 1 .- POSITIVO
- 2 .- INDETERMINADO
- 3 .- INDETERMINADO
- 4 .- NEGATIVO

PATRONES**INTERPRETACION**

Ausencia de bandas

NEGATIVO

Presencia de bandas que no correspondan
al criterio de **POSITIVO**

INDETERMINADO

La presencia de bandas de las protenas
p24, p31 y otras como gp41, gp160. Cada
banda tiene una reactividad de (+) o mayor
Comunmente las bandas gp41 y gp160 suelen
ser difusas.

POSITIVO

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 RESULTADOS

En 1990 el número de donadores de sangre estudiados fue de 31,311, los cuales procedían de los diferentes hospitales tanto del sector salud como del sector privado del área Metropolitana del D.F. Se empleó para su estudio la prueba de escrutinio ELISA para detectar anticuerpos contra el VIH-1 de la marca ABBOTT. De las muestras séricas disponibles en el Banco de Sueros, independientemente si fueron inicialmente reactivas o no, se obtuvieron para este estudio 2,090 (6.67%) sueros que fueron sometidos a una reevaluación con las siguientes técnicas.

- 1.- Aglutinación de partículas de gelatina (SERODIA, miles).
- 2.- Du Pont (ELISA de 1a. generación)
- 3.- ABBOTT (ELISA de 1a. generación)
- 4.- ORGANON VIRONOSTIKA (ELISA de 1a. generación).
- 5.- BEHRING (ELISA de 1a. generación).

Se definió que una muestra sérica era reactiva bajo los siguientes criterios.

- 1.- Valor de la muestra por encima del punto de corte (ELISAS INDIRECTA).
- 2.- Valor de la muestra igual del punto de corte.

3 - Se considero que las muestras cercanas al valor de corte (20%) que se encontraban en zona gris, por lo que se re-evaluaron

4 - Valor de la muestra por debajo del punto de corte (ELISA COMPETITIVA).

Cuando alguna de las muestras cumplió con cualesquiera de los criterios anteriores se procedió a realizar la técnica de Inmunoelctrotransferencia (Western Blot) para confirmar el hallazgo.

En 42 muestras de sueros se presentó reactividad en alguna de las técnicas de escrutinio (ELISA o Aglutinación) (2.00%).

En la tabla #1 se pueden observar la reactividad encontrada en cada una de las técnicas utilizadas.

Tabla #1

PRUEBA	TOTAL DE MUESTRAS	%
AGLUTINACION SERODIA	2 MUESTRAS	1.00 %
ELISA DU PONT	29 MUESTRAS	1.38 %
ELISA ABBOTT	7 MUESTRAS	0.33 %
ELISA BEHRING	4 MUESTRAS	0.19 %
ELISA ORGANON	4 MUESTRAS	0.19 %

A estas 42 muestras se les realizó Western Blot obteniendo los siguientes resultados, Tabla #2.

Tabla # 2

Patron Positivo	0
Patrón Negativo	23
Patrón Indeterminado	19

En la tabla #3 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de tamiz

En la tabla #4 se observan los patrones de respuesta encontrados en Western Blot.

La frecuencia de bandas que aparecieron en Western Blot se muestra en la tabla #5

Tabla # 5

p17	7 casos	gp66/17	1 caso	gp160/41	1 caso
p24	3 casos	gp55/17	1 caso	p24/17	1 caso
gp160	2 casos	gp160/17	1 caso		
gp66	1 caso	gp51/17	1 caso		

De las 19 muestras con patrón indeterminado, el nivel de detección por técnica utilizada se resume en la Tabla #6

Tabla #6

PRUEBA	NIVEL DE DETECCION	%
AGLUTINACION SERODIA	13	0.62
ELISA DUPONT	12	0.57
ELISA ABBOTT	6	0.28
ELISA ORGANON	2	0.09
ELISA BEHRING	1	0.04

Obsérvese en la tabla #5 la alta frecuencia de la p17 proteína del gen "gag".

Debido al costo que representa el trabajar con diferentes metodologías de ELISA para la determinación de anticuerpos contra el VIH, no fue posible hacer un seguimiento en los subsecuentes años. Esto podría dar pauta a un posterior trabajo de seguimiento a patrones indeterminados en la técnica de Western Blot para donadores de sangre .

4.2 DISCUSION

1.- Debido a las bajas prevalencias de VIH y al formato de autoexclusión en donadores de sangre es muy probable que las muestras con patrón indeterminado sean negativas.

2.- Se puede observar que debido a que los indeterminados no son considerados negativos ni

positivos no se puede deducir la sensibilidad ni especificidad de las pruebas aquí trabajadas.

3.- Se hace evidente que con pruebas de tamiz para detectar anticuerpos contra el VIH no se lograría detectar con certeza a los positivos verdaderos, las pruebas de tamiz tienen una alta sensibilidad lo que disminuye la especificidad de las mismas por lo que en una población de baja prevalencia (donadores de sangre) para el VIH aumentan los falsos positivos.

4.- La banda predominante en la población de indeterminados obtenida es p17 que pertenece al gen "gag" lo cual puede deberse a una o varias causas, entre ellas reacción cruzada con otros retrovirus o bien otras infecciones, por lo tanto no es concluyente este patrón de bandas y se recomienda el seguimiento de éstos donadores.

T A B L A # 3

COMPARACION DE LAS DIFERENTES PRUEBAS DE TAMIZ Y SUS
RESULTADOS EN LOS DONADORES DE SANGRE

MUESTRA	SERODIA	DUPONT INDIRECTA		BEHRING COMPETITIVA		ORGANON INDIRECTA		ABBOTT INDIRECTA	
		PC	DO	PC	DO	PC	DO	PC	DO
1	N	0.814	0.981(+)	0.965	1.401	0.550	0.040	0.207	0.004
2	+	0.317	0.317(+)	0.965	0.983(+)	0.550	0.120	0.207	0.010
3	+	0.317	0.166	0.965	1.203	0.550	0.140	0.207	0.150
4	N	0.474	0.958	0.965	1.400	0.550	0.201	0.207	0.090
5	N	0.814	0.893(+)	0.965	1.180	0.550	0.304	0.207	0.075
6	N	0.442	1.155(+)	0.965	1.315	0.550	0.080	0.207	0.001
7	N	0.474	1.070(+)	0.965	1.400	0.550	0.015	0.207	0.006
8	N	0.442	0.899(+)	0.965	1.106	0.550	0.120	0.207	0.010
9	N	0.442	1.138(+)	0.965	1.090	0.550	0.154	0.207	0.110
10	N	0.421	0.641	0.965	1.701	0.550	0.470	0.207	0.095
11	+	0.567	0.411	0.965	1.640	0.550	0.384	0.207	0.084
12	N	0.567	0.466 ZG	0.965	1.538	0.550	0.201	0.207	0.073
13	N	0.829	1.142(+)	0.965	1.103	0.550	0.320	0.207	0.120
14	N	0.829	0.981(+)	0.965	1.450	0.550	0.410	0.207	0.044
15	+	0.829	1.736(+)	0.965	1.070	0.550	0.075	0.207	0.053
16	N	0.641	0.828(+)	0.965	1.300	0.550	0.091	0.207	0.215(+)
17	N	0.457	0.787(+)	0.965	1.215	0.550	0.164	0.207	0.008
18	N	0.474	0.578(+)	0.965	1.090(+)	0.550	0.210	0.207	0.073
19	+	0.641	0.155	0.965	1.415	0.550	0.315	0.207	0.054
20	+	0.641	0.450	0.965	1.301	0.550	0.440	0.207	0.101
21	+	0.641	0.457	0.965	1.202	0.550	0.075	0.207	0.077

ZG - ZONA GRIS
PC - PUNTO DE CORTE
DO - DENSIDAD OPTICA (LECTURA DEL FOTOMETRO
N - NEGATIVO
+ - POSITIVO

TABLA # 3

CONTINUACION

MUESTRA	SERODIA	DUPONT		BEHRING		ORGANON		ABBOTT	
		INDIRECTA		COMPETITIVA		INDIRECTA		INDIRECTA	
		PC	DO	PC	DO	PC	DO	PC	DO
22	+	0.641	0.085	0.965	1.610	0.550	0.060	0.207	0.015
23	+	0.598	0.183	0.965	1.425	0.550	0.132	0.207	0.173 ZG
24	+	0.598	0.135	0.965	1.140	0.550	0.140	0.207	0.084
25	+	0.598	0.207	0.965	1.201	0.550	0.310	0.207	0.209
26	N	0.457	0.874(+)	0.965	1.380	0.550	0.293	0.207	0.109
27	+	0.598	0.275	0.965	1.415	0.550	0.480 ZG	0.207	0.007
28	N	0.457	0.695(+)	0.965	1.320	0.550	0.095	0.207	0.071
29	N	0.457	0.548(+)	0.965	1.530	0.550	0.015	0.207	0.011
30	-	0.511	0.070	0.965	1.670	0.550	0.101	0.207	0.280(+)
31	+	0.641	0.101	0.965	1.510	0.550	0.204	0.207	0.098
32	N	0.641	0.041	0.965	1.501	0.550	0.115	0.207	0.103
33	-	0.641	0.035	0.965	1.404	0.550	0.314	0.207	0.056
34	-	0.641	0.371	0.965	1.203	0.550	0.460 ZG	0.207	0.047
35	-	0.474	0.491(+)	0.965	1.090(+)	0.550	0.075	0.207	0.052
36	N	0.474	0.703(+)	0.965	1.400	0.550	0.081	0.207	0.210(+)
37	+	0.571	1.551(+)	0.965	1.150	0.550	0.168	0.207	0.085
38	+	0.474	0.838(+)	0.965	1.800	0.550	0.297	0.207	0.330(+)
39	+	0.511	0.882(+)	0.965	1.713	0.550	0.309	0.207	0.103
40	+	0.511	1.323(+)	0.965	1.415	0.550	0.400	0.207	0.105
41	N	0.474	0.343	0.965	1.380	0.550	1.500(+)	0.207	0.145
42	N	0.474	0.698(+)	0.965	1.410	0.550	1.740(+)	0.207	0.077

ZG - ZONA GRIS

PC - PUNTO DE CORTE

DO - DENSIDAD OPTICA

N - NEGATIVO

+ - POSITIVO

TABLA # 4

SUEROS REACTIVOS

COMPARACION DE SUEROS DE DONADORES CON REACTIVIDAD EN ALGUNA PRUEBA Y SU RESPUESTA EN WESTERN BLOT.

MUESTRA	WESTERN BLOT	SERODIA AGLUTINACION	DUPONT INDIRECTA		BEHRING COMPETITIVA		ORGANON INDIRECTA		ABBOTT INDIRECTA	
			PC	DO	PC	DO	PC	DO	PC	DO
1	p17	N	0.814	0.981(+)	0.987	1.401	0.704	0.180	0.203	0.037
10	p17	N	0.421	0.641(+)	0.987	1.315	0.704	0.181	0.203	0.026
11	p17	+	0.567	0.411	0.987	1.453	0.451	0.214	0.203	0.099
12	p17	N	0.535	0.426 ZG	0.987	1.315	0.704	0.056	0.203	0.184 ZG
15	gp55.p17	+	0.829	0.736 ZG	0.987	1.376	0.451	0.188	0.203	0.037
16	gp66.p17	+	0.457	0.826(+)	0.987	1.431	0.218	0.112	0.203	0.269(+)
24	p24.p17	+	0.598	0.135	0.987	1.702	0.218	0.076	0.203	0.027
25	p17	+	0.598	0.207	0.987	1.238	0.704	0.132	0.203	0.167 ZG
27	gp160	+	0.641	0.275	0.987	1.660	0.576	0.183	0.203	0.107
30	gp160.gp24	+	0.511	0.070	0.987	1.301	0.704	0.080	0.203	0.201(+)
34	gp160	+	0.641	0.371	0.987	1.485	0.576	0.225	0.203	0.008
35	p24	+	0.474	0.491(+)	0.987	1.176 ZG	0.576	0.311	0.177	0.008
36	gp160.p17	N	0.203	0.703(+)	0.987	1.317	0.451	0.183	0.203	0.203(+)
37	gp51.p17	+	0.511	0.551(+)	0.987	1.243	0.218	0.056	0.177	0.019
38	p17	+	0.474	0.838(+)	0.987	1.329	0.218	0.076	0.203	0.310(+)
39	p17	+	0.511	0.882(+)	0.987	1.306	0.218	0.098	0.203	0.104
40	gp66	+	0.511	1.323(+)	0.987	1.542	0.218	0.137	0.203	0.025
41	p24	N	0.474	0.343	0.987	1.240	0.704	0.559 ZG	0.177	0.352
42	p24	N	0.474	0.689(+)	0.987	1.303	0.704	0.929(+)	0.203	0.078

79

ZG - ZONA GRIS

PC - PUNTO DE CORTE
 DO - DENSIDAD OPTICA
 N - NEGATIVO
 + - POSITIVO

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1.- De los 2,090 donadores que se trabajaron en el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea en 1990 para el trabajo, se encontró un patrón de indeterminados de 19 donadores (0.9%) en la técnica de Western Blot.

La reactividad encontrada en el total de los sueros trabajados fue del 2.00%.

2.- Se sabe que actualmente la prevalencia de infección a VIH por transfusión sanguínea es baja (10.2%) (25) y se recomienda que por seguridad los productos de estos donadores con patrón indeterminado no sean transfundidos.

3.- Es necesario el seguimiento de los indeterminados con estudios de escrutinio y confirmación, así mismo se deben tener presentes los lineamientos que establecen los criterios de positividad e indeterminados al VIH.

4.- Las pruebas de escrutinio definitivamente disminuyen en forma considerable la probabilidad de infección por VIH en transfusiones sanguíneas del mismo modo los interrogatorios sobre antecedentes de riesgo y los formatos de autoexclusión, como lo muestran los estudios epidemiológicos actuales.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alcalde X, Weiss R, Staller J, Prozorovsky L, Knigge K, Pennington R, Clinical evaluation of test pack HIV-I/HIV-II rapid assay for the detection of antibody to HIV-I and HIV-II proteins. V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts), Montréal Québec, Canada. 371a, 1989.
- 2.- ABBOTT Cientifica, S.A. RETROVIRUS. División Diagnósticos. 1-95/ 1993.
- 3.- Argirova R, Bodjeva E, Ivanova V, Beshkov D, Troshev O. Interpretation and follow-up of "Indeterminate" Western Blot (WB) test results. V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts). Montréal Québec, Canada. 381a, 1989.
- 4.- Barriga Angulo G Cardeña Capetillo J. Avances recientes en el diagnóstico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Rev Patol Clin (México). 32/4/152-158. 1985
- 5.- Bernard Henry John. Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. Masson-Salvat Medicina. 9a./ 939-942. 1290-1292/ 1993.
- 6.- Benítez Bribiesca L. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), una nueva entidad nosológica. Rev Med IMSS. 21/6/527-536. 1983.
- 7.- Biotech Research Laboratories, INC. U.S. License No.1035. E.I.Du Pont de Nemours & CO.

Medical products department. U.S: License No.967. Mayo 1987.

8.- Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Año 1. # 7. Septiembre 1987.

9.- Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Año 1. # 8. Octubre 1987.

10.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Año 1. # 9. Noviembre 1987.

11.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Año 3. # 4. Abril 1989.

12.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Año 3. # 5. Mayo 1989.

13.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Año 3. # 6. Junio 1989.

14.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Año 3. # 7. Julio 1989.

15.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Año 5. # 1. Enero 1991.

16.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia

Epidemiológicos. Año 5. # 2. Febrero 1991.

17.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Naional de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos. Año 5. # 3. Marzo 1991.

18.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos. Año 5. # 4. Abril 1991.

19.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Naional de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos. Año 5. # 5. Mayo 1991.

20.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Naional de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos. Año 6. # 2. Febrero 1992.

21.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Naional de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos. Año 7. # 1. Enero 1993.

22.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Naional de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos. Año 8. # 7. Octubre 1994.

23.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Naional de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos. Año 8. # 8. Noviembre 1994.

24.-Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Naional de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos. Año 8. # 9. Diciembre 1994.

25.- Boletín mensual SIDA/ETS. Editado por el Instituto Naional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Año 9 # 3 Marzo 1995.

26.- Bouzas MB, Muchinik G, Pichio G, Simon F, Mathov I, Brun Vezinet F. Croos-reactivity between ELISA's for detection of HIV-1 and HIV-2. The Scientific and Social Challenge (Abstracts), Montréal Québec, Canada. 343a, 1989.

27.- Brooks Jackson J, et al. Absence of HIV infection in blood donors with indeterminate western blot test for antibody to HIV-1. N Engl J Med. 25/217-222. 1990.

28.- Brooks Jackson, Hamson M, Kwok S, Stramer S, Balfour HH Jr, MacDonald K, et al. HIV-Infection in western blot indeterminate blood donors. Abstracts Accepted for Presentation at the V International Conference on AIDS. 3a, 1989.

29.- Bush M, Bueno C, Cordell R. Evaluation of SERODIA particle agglutination assay for antibody to HIV. V Internaconal Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts), Montréal Québec, Canada 250a, 1989.

30.- Centers for Disease Control. Public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing acquired immunodeficiency syndrome. MMWR. 34/1-5. 1985.

31.- Centers for Disease Control. Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. MMWR 38/1-6. 1989.

- 32.- Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from west African patients with AIDS. Science. 233/343-346. 1986.
- 33.- De Andres Medina Rafael. Historia natural de la infección del VIH. Unidad de SIDA CNMVIS. Instituto de Salud Carlos III. España 1986.
- 34.- Dock NL, Lamberson HV JR, O'Brien TA, Tribe DE, Alexander SS, Poiesz. Evaluation of atypical human immunodeficiency virus immunoblot reactivity in blood donors. Transfusion 28/412-418. 1988.
- 35.- Dominguez J, Morales C, Romero M, Moreno M, Orozco M. Evaluation of different anti-HIV reagents that are available in México. International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts). Montreal Quebec, Canada. 343a, 1989.
- 36.- Eberle J, Gathof B, Bäcker U, Gossrau E, Stute R, Baumgarten K, Reissigl H, Gürtler L, Peinhart F. p24 HIV antigen screening of blood donors. V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts). Montreal Quebec, Canada. 246a, 1989.
- 37- Eble B, Bush M, Hurt M, Nason M, Garner J, Gultinan A, Vyas G, Khayam-Bashi H. Resolution of western blot indeterminate and high-risk sero-negative blood donors by PCR. Sixth International Conference on AIDS. Final program and Abstracts, San Francisco California USA. 1/12/136. 1990.
- 38- Fang C, Le P Mallory D, et al. Western blot patterns of antibodies to human immunodeficiency virus (HIV). Transfusion. 27/539. 1988.

39- FREEMAN B.A. Virus RNA Tumorales. TRATADO DE MICROBIOLOGIA de Burrows. 21a. Edición. 1987.

40.- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science. 224/503-505. 1984

41.- Garrison L, Thun MK, Femie B, Farzadegan H, Clemens ML. Western blot: indeterminate results and lot-to-lot variability in adults at low risk for HIV-1 infection. V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts), Montreal Quebec, Canada. 307a, 1989.

42.- Gaynor S, Hosein B, Del Valle C, Blanco C. et al. Experience with notification and follow-up of western blot indeterminate donors. V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts). Montreal Quebec, Canada. 247a, 1989.

43.- Genesca Joan, Beissy WJ, Epstein S Jay, Way-Ktos J, Indira KH, Harvey J Alner. What do western blot indeterminate patterns for human immunodeficiency virus mean in EIA-negative blood donors?. LANCET. 1023-1025. 1989.

44.- Genesca J, Shih J, Jett B, Hewlitt I, Epstein J, Alter H. Significance of an indeterminate HIV western blot (WBi). V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts), Montreal Quebec, Canada. 368a, 1989.

45.- Hein Karen, Theresa foy Digeronimo y Editores del Consumer Reports Book. SIDA verdades en lugar de miedo. Una guía para jóvenes. PROMEXA. 9-18. 1991.

- 46.-Huisman JG, Winkel IN, Leilie PN, Tersmette M, Goudsmit J, Miedema F. Detection of early anti- p24 HIV response in EIA and immunoblot-negative individuals. Vox Sang 53/31-36. 1987.
- 47.- Hunt J, Boardway K, Gutierrez R, Dawson G, Sarin V, Devare, Sushil. Unique and cross-reactive antigenic regions within the transmembrane proteins of HIV-1/HIV-2, and their utility in diagnosis of viral infections. Abstracts Accepted for presentation at the V International Conference on AIDS. 3a, 1989.
- 48.- Iglesias SL, Torres AS, Lara PE, Isibasi A, Acosta AG. Análisis Inmunoenzimático. Rev Patol Clin (México). 32/2/53-59. 1985.
- 49.- Jaffe HW, Sarngadharan MG, DeVico AI, Getchell JP, Kalyanaraman VS, Haverkos HW, Stoneburrer RL, Gallo RC, Curran JW. Infection with HTLV-III/LAV and transfusion-associated acquired immunodeficiency syndrome. Serologic-evidence of an association. JAMA 254/6/770-773. 1985.
- 50.- Jean-Pierre A.MD, PH.D. Gallo RC M.D, Luc Montagnier M.D. Human retroviruses and disease they cause. Symposium highlights. Presented as a service to the medical profession by Abbott Diagnostics Educational Services, Chicago Illinois. 1988.
- 51.- Kuhl P, Seidl S, Holzberger G. HLA DR-4 antibodies cause positive HTLV-III antibody ELISA results. Lancet. 1222-1223. 1985
- 52.- Kvinesdal Birgit, Lauritzen Edgar, Poulsen Anne-Grethe, Faber Vestergaard Bent. HIV-antibody testing and false-positive p24 reactivity. Vox Sang. 56/131-132. 1989.

53.- Lee HH, Sherwood WC, Smith DE, Tegtmeier GE, Fernando LP, Fang CT, Kleinman SH. HTLV-I and HTLV-II infection in U.S. blood donors is associated with different risk factors. Sixth International Conference on AIDS. Final program and Abstracts. 1/302/195. 1990.

54.- Lepine DG, Neuman PW, Frenette SI, O'Shaughnessy MV. Evaluation of a protein enzyme immunoassay. Clin Microbiol 28/1169-1171. 1990.

55.- Lockwood DYP, Hyman J, Holody T, Butman B, Tondreau S. Comparison of the Organon teknika corporation HIV antigen assay with six commercially available HIV antigen test kits. V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts), Montreal Quebec, Canada. 303a, 1989.

56.- MANUAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA VIH/SIDA. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. Secretaria de Salud. 1-9. 1990.

57.- Niel T. Constantine, Ph.D.MT (ASCP. Johnny D. Callalan, B.S.M.T.), Douglas M. Watts, Ph.D. HIV Testing & quality control. A guide for Laboratory Personnel. Family Health International Durham, North Carolina USA. 11-13/ 21-70/ 72-73/ 106-115. 1991.

58.- Nusbachre J, Naiman R. Longitudinal follow-up of blood donors found to be reactive for antibody to human immunodeficiency virus (anti-HIV) by enzyme-linked immunoassay (EIA +) but negative by western blot (wb -). Transfusion. 4/365-367. 1989.

- 59.- Paeters Martino, Franssen K, De La Porte E, Haesevelde VM, Saman E, Vander Groen G, Piot P. A new immunodeficiency virus isolate from a wild captured chimpanzee: SIVcpz-ant-1. Sixth International Conference on AIDS. Final Program and Abstracts, San Francisco California USA. 1/276/189. 1990.
- 60.-P.Morimer Philip. The Fallibility of HIV Western Blot. *The Lancet*. 337/286-287. 1991
- 61.-Perrault R, Mankikar S, Adata A. Human immunodeficiency virus antibody screening of blood donors-an international survey. V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts), Montreal Quebec, Canada. 345a, 1989.
- 62.- Phair J, Crisler J, Huprikar J, Tsung LH, Chmiel J. Early serologic evidence of infection with human immunodeficiency virus type 1. (HIV-1). V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts), Montreal Québec, Canada. 379a, 1989.
- 63.-Ranki A, Valle S.Krohn M, et al. Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted human immunodeficiency-virus infection. *Lancet*. 589-593. 1987.
- 64.-Scalia V, Buchner BK, Reeves JP, Sabourin L, Gill P. Use of three recombinant assays to test blood donors sample with western blot (WB) indeterminate patterns. V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts), Montreal Quebec, Canada. 250a. 1989.
- 65.- Schupbach J, Popovic M, Gilden RV, et al. Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science*. 224/503-505. 1984.

66.- Soler C, Mosqueira C, Morales C, Valdespino JL, Sepúlveda J. Evaluation of twelve commercial kits for screening of HIV-I antibodies in México. V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts) Montreal Quebec, Canada. 179a. 1989.

67.- Steven Mc Dougal J, Jaffe Harold, D Cabridilla Cirilo, Sarnadharan MG, KA Nicholson Janet, Kalyanaraman VS, C Gallo Robert, W Curran James. Screening test for blood donors presumed to have transmitted the acquired immunodeficiency syndrome. Blood. 65/3/772-775. 1985.

68.- Taylor Patricia, Stevens C, Lee H. Anti-HTLV-I in New York blood donors (1985-1986). Abstracts Accepted for Presentation at the V International Conference on AIDS. 13a, 1989.

69.- Tribe DE, Reed DL, Lindell P, Kenealy WR, Ferguson BQ, Cybulski R, Winslow D, Waselefsky DM, Patteway SR JR. Antibodies reactive with human immunodeficiency virus gag-coded antigens (gag reactive only) are a major cause of enzyme-linked immunosorbent assay reactive in a blood donor population. J Clin Microbiol. 641-647. 1988

70.- Tsang VCM, Peralta JM, Simons AR. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITMethB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Methods in Enzymol. 92/ 377-391. 1983

71.- Valdespino Jose L, Soler Carmen, López Angélica, Velázquez Liliana, Del Rio Aurora. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas. Red Nacional de Laboratorios de VIH/SIDA. 25-30. 1994.

72.- Van der Poel CL, Lelie PN, Reesink HW, Van Exel-Oehlers PJ, Termette M, Van den Akker R, Gonzalves M, Huisman JG. Blood donors with indeterminate anti-p24 gag reactivity in HIV-1 western blot: absence of infectivity to transfused patients and in virus cultura. *Vox Sang.* 56/162-167. 1989.

73.- Williams AE, Chyang TF, Dennis JS, Bernard JP, Sandler SG, Darril WF, Shulman G, McGowan EI, Deborah KD, Bowman RJ, Peetom F, Kleinman SH, Lenes B, Dodd YR. Seroprevalence and epidemiological correlates of HTLV-I infection in U.S. blood donors. Science. 240/ 643-646. 1988.

74.-Williams AE, Creedon KW, Grandienetti T, Sullivan MT, and the American Red Cross Collaborative HIV Study Group, Holland JH Laboratory, Rockville, MD, USA. Serological evidence of prior sexually transmitted disease in HIV-1 seropositive blood donors. V International Conference on AIDS. The Scientific and Social Challenge (Abstracts), Montreal Quebec, Canada. 246a. 1989.

75.- Wiltbank TB, McCarroll DR, Wartick MG. An undetectable source of technical error that could lead to false negative results in enzyme linked immunosorbent assay of antibodies to HIV-1. Transfusion 29/ 1/ 75-77. 1989.

APENDICE

REACTIVOS

- Solución de reconstitución. (Laboratorios MILES), solución de fosfato de sodio dibásico, fosfato de potasio monobásico, cloruro de sodio y ázida sódica. Se utiliza para la reconstitución de las partículas sensibilizadas y no sensibilizadas.

- Diluyente del suero. (Laboratorios MILES), solución de fosfato de sodio, fosfato de potasio dibásico, monobásico, cloruro de sodio, ázida sódica. Se utiliza para la dilución de especímenes.

- Partículas sensibilizadas. (Laboratorios MILES), preparación liofilizada de partículas de gelatina sensibilizadas con antígeno VIH inactivado. Para reconstituir esta solución añadir la cantidad descrita de solución en el momento de su uso. La solución reconstituida contiene 1% de partículas de gelatina sensibilizadas con antígeno inactivado VIH.

- Partículas no sensibilizadas. (Laboratorios MILES), preparación liofilizada de partículas de gelatina. Para reconstituir esta solución añadir la cantidad descrita en el momento de su uso.

- Control Positivo. (Laboratorios MILES), suero de conejo con antígeno VIH inactivado preparado de manera de mostrar títulos de anticuerpos de 1:128 cuando se verifica bajo el mismo procedimiento de prueba utilizando los especímenes.

Control Negativo. suero humano normal, no reactivo para el antígeno de superficie de la Hepatitis B y para los anticuerpos contra VIH-1 (Laboratorios DuPont).

- Control Positivo. Suero humano inactivado contiene un alto título de anticuerpos específicos a los antígenos del VIH-1, no reactivo para el antígeno de superficie de la Hepatitis B (Laboratorios

DuPont).

- Diluyente de muestras y conjugado. Solución buffer salina-fosfatos contiene tween 20, albúmina bovina, suero normal de cabra tratado con calor, (&) (Laboratorios DuPont).

- Conjugado. Fosfatasa alcalina liofilizada conjugada con anticuerpos anti-IgG humanos obtenidos de cabra, (&) (Laboratorios DuPont).

- Concentrado de buffer para el sustrato (DEA). Concentrado, contiene cloruro de magnesio y ditanolamina. Contiene 0.1% de ázida de sodio como conservador (Laboratorios DuPont).

- Sustrato Tabletas (pNPP). Cada tableta contiene 18 mg de ácido libre de para-nitrofenilfosfato (Laboratorios DuPont).

- Solución de detenimiento (NaOH 3N). Hidróxido de sodio en agua desionizada (Laboratorios DuPont).

- Concentrado para el lavado de la placa; concentrado de buffer salina-fosfato y tween 20, contiene 1% de cloroacetamida como conservador (Laboratorios DuPont).

NOTA: (&) Contiene 0.1% de ázida de sodio y 0.005% de timersal como conservador.

- Solución de hipoclorito de sodio al 5%.

- 100 esferas recubiertas de antígeno VIH-1 (rDNA). (Laboratorios ABBOTT).

- 3 frascos (1 ml cada uno) de concentrado de conjugado, anti-IgG humana (cabra); peroxidasa (rábano picante). Concentración mínima 0.01 ug/ml en tampón TRIS con colorante rojo, medio de conservación agentes antimicrobianos. (Laboratorios ABBOTT).

- 3 frascos (20 ml cada uno) de diluyente de conjugado; contiene suero bovino y de cabra (Laboratorios ABBOTT).

- 1 frasco (2.1 ml) de control positivo, plasma humano inactivado positivo para el anticuerpo anti-VIH-1 con colorante azul, título mínimo 1:2. (Laboratorios ABBOTT).
- 1 frasco (2.1 ml) de control negativo, plasma humano negativo para el anticuerpo anti-VIH-1 (Laboratorios ABBOTT).
- 2 frascos (20 ml cada uno) de diluyente de muestras, contiene suero bovino y de cabra, medio de conservación: ázida sódica al 0.1% (Laboratorios ABBOTT).
- 1 botella (10 tabletas) de tabletas de OPD (orto-fenilendiamina-2 HCl) (Laboratorios ABBOTT).
- 1 botella (55 ml) de diluyente para OPD, tampón de citratos-fosfatos con 0.02% de peróxido de hidrógeno, (Laboratorios ABBOTT).
- Ácido sulfúrico 1N.
- Viales de conjugado liofilizado; inmunoglobulinas antihumanas de cabra marcadas con peroxidasa de rábano picante (Laboratorios Organon Teknika).
- Viales, cada uno con 49 ml de suero normal de cabra, estabilizado con 0.1 g/l de mertiolato (Laboratorios Organon Teknika).
- Vial con 27 ml de tampón de dilución concentrado, el cual debe diluirse 1:20 antes de su uso (Laboratorios Organon Teknika).
- Una botella con 100 ml de tampón de fosfatos concentrado, tampón de lavado, el cual debe diluirse 1:25 antes de su uso (Laboratorios Organon Teknika).
- Viales con 20 tabletas de OPD (dihidrocloruro de orto-fenilendiamina) y una cápsula de gel de sílice como agente desecante (Laboratorios Organon Teknika).
- Sobres con una tableta de peróxido de urea (Laboratorios Organon Teknika).

- Viales de control negativo liofilizado, suero humano anti-HTLV-III negativo (Laboratorios Organon Teknika).
- Viales de control positivo débil liofilizado, suero humano anti-HTLV-III débilmente positivo, (Laboratorios Organon Teknika).
- Viales de control positivo fuerte liofilizado, suero humano anti-HTLV-III fuertemente positivo (Laboratorios Organon Teknika).
- Ácido sulfúrico 2 mol/l (4N) para análisis.
- Conjugado anti-VIH humano, conjugado con peroxidasa OPD, agente de conservación fenol (máx. 1 g/l) (Laboratorios Behring).
- Suero control anti-VIH positivo Suero humano inactivado que contiene anticuerpos contra VIH, agente de conservación, fenol (máx. 1 g/l) (Laboratorios Behring).
- Suero control anti-VIH negativo. suero humano normal sin anticuerpos contra el VIH, agente de conservación, fenol (máx. 1 g/l) (Laboratorios Behring).
- Solución de lavado OPD (concentrado), solución tampón de fosfato que contiene tween # 20, (Laboratorios Behring)
- Tampón/substrato, peróxido de hidrógeno (aprox.0.1 g/l) en solución tampón acetato. (Laboratorios Behring).
- Cromógeno: clorhidrato de tetrametilbenzidina. (Laboratorios Behring).
- Solución de detenimiento OPD. Ácido sulfúrico 0.5 N. (Laboratorios Behring).
- Control negativo, suero normal humano no reactivo a anticuerpos VIH y antígenos de superficie de Hepatitis B. (Laboratorios DuPont).

- Control positivo débil, suero humano inactivado contiene un bajo título de anticuerpos para los antígenos de VIH; no es reactivo para los antígenos de superficie de la Hepatitis B. (Laboratorios DuPont).
- Control positivo fuerte, suero humano inactivado contiene un alto título de anticuerpos para los antígenos de VIH; no es reactivo para los antígenos de superficie de la Hepatitis B (Laboratorios DuPont).
- Solución concentrada, cuando se diluye 1:20 contiene 0.02 M TRIS, 0.1 M de cloruro de sodio, 0.03% Tween 20, y 0.005% de timerosal como conservador, pH 7.4. (Laboratorios DuPont).
- Solución de trabajo, solución concentrada, cuando se diluye 1:10 contiene 0.02 M TRIS, 0.1 M de cloruro de sodio, también contiene suero bovino normal inactivado por calor y 0.01% de timerosal como conservador (Laboratorios DuPont).
- Conjugado 1. Anticuerpos Anti-IgG humanos obtenidos a partir de cabra con biotina, con cadenas ligeras y pesadas. Contiene 0.08% de ázida de sodio y 0.002% de timerosal como conservador (Laboratorios DuPont).
- Conjugado 2. Avidina conjugada obtenida de caballo unida a peroxidasa, contiene 0.1% de timerosal como conservador (Laboratorios DuPont).
- Substrato A. 7.8 mM solución de 1-cloro-1-naftol en una solución de alcohol (Laboratorios DuPont).
- Substrato B. Solución de peróxido de hidrógeno acuoso (0.02%) en buffer de citratos (Laboratorios DuPont).
- Polvo de trabajo. Leche liofilizada, esterilizada, (Laboratorios DuPont).

EQUIPOS COMERCIALES.

- ADAMS ANALYTICAL CENTRIFUGE Division of Becton Dickinson and Company.
- Estufa para laboratorio. Rango 20-60°C. Rios Rocha S.A. Marca Registrada. Modelo EC-33.
- AUTOMATIC OR MANUAL MICROPLATE WASHER. Du Pont Company. Medical Products
Wilmington, U.S.A.
- MICROPLATE READER. Capable of transmitting et.a wavelength of 405 nm or 410 nm. DuPont
Company. Medical Products. Wilmington U.S.A.
- SAMPLE MANAGEMENT CENTER. COMMANDER. ABBOTT Laboratories. Diagnostics
Division. Irving Texas. U.S.A.
- PARALLEL PROCESSING CENTER. COMMANDER. ABBOTT Laboratories. Diagnostics
Division. Irving Texas U.S.A.
- DYNAMIC INCUBATOR. ABBOTT Laboratories. Diagnostics Division. North Chicago, U.S.A.
- MICROELISA READER OR STRIPREADER . Organon Teknika. Equipado con un filtro de
492nm. Boxtell N.L.
- WASHER MICROELISA. Organon Teknika. B.V. Boxtell Holland, Boxtell N.L.
- BEHRING ELISA PROCESSOR II Manufacturer Messer Griesheim GmbH. Frankfurt/M,
W-Germany Distributor Behring-werke AG, Marburg.
- AMERICAN ROTATOR V. Mfd by American Dade. Division of American Hospital Supply Corp.
Miami F.L. U.S.A.

PREPARACION DE REACTIVOS

-PREPARACION DEL CONJUGADO (DuPont) Llevar el vial del reactivo, conjugado liofilizado, a una temperatura ambiente (15-30°C), adicionar 1.0 ml de agua destilada al vial del conjugado liofilizado. Dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente con inversiones ocasionales, una vez reconstituido el conjugado es estable un mes a una temperatura de 2-8°C.

Para preparar la solución del conjugado hay que hacer previamente una dilución de 1:700 del conjugado reconstituido como sigue:

Adicionar 14.00 ml del diluyente de forma cónica alrededor del tubo de polipropileno.

USAR SOLAMENTE TUBOS DE POLIPROPILENO PARA LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL CONJUGADO.

Adicionar 20 µl de conjugado reconstituido por inversión suave; regresar el conjugado reconstituido sobrante a una temperatura de 2-8°C inmediatamente después de su uso.

Usar la solución de conjugado. La solución del conjugado es estable a 2-8°C por una semana. El volumen de la solución de conjugado preparado es suficiente para trabajar una microplaca.

-PREPARACION DEL CONCENTRADO PARA EL LAVADO DE LA MICROPLACA (DuPont)

Llevar el reactivo concentrado para el lavado, a una temperatura ambiente (15-30°C) antes de su uso, para que se disuelvan los cristales.

Diluir un volumen de concentrado de lavado con 9 volúmenes de agua destilada. Aproximadamente

350 ml de concentrado de lavado diluido es usado para lavar una microplaca. Esta solución es estable una semana a temperatura ambiente.

-PREPARACION DE LA SOLUCION DE SUBSTRATO (DuPont) Preparar la solución sustrato durante los 5-10 minutos antes del término del período de incubación del conjugado. Una vez preparada la solución es estable solamente 30 minutos. Preparar la suficiente cantidad para la placa, el exceso de solución debe ser eliminado.

- Adicionar 5 ml del buffer concentrado a 20 ml de agua destilada, mezclar.

- Adicionar una tableta de sustrato a 25 ml de buffer diluido, disolver la tableta con agitación, verificar de la completa disolución de la tableta antes de su uso.

- El buffer diluido es estable 12 horas a temperatura ambiente.

NO PREPARAR LA SOLUCION DE SUBSTRATO JUSTAMENTE ANTES DE SU USO.

- PREPARACION DEL REACTIVO DE CONJUGADO (ABBOTT) Tanto el concentrado de conjugado como el diluyente para el conjugado deberán llevarse a temperatura ambiente antes de mezclarlos (15-30°C).

-Vaciar cuidadosamente el contenido de un frasco de concentrado de conjugado (con colorante rojo), dentro de un frasco de diluyente de conjugado .

-Volver a tapar herméticamente el frasco grande, homogeneizar el contenido. El contenido deberá adquirir un color rojo.

Un frasco de conjugado diluido basta para efectuar 100 pruebas, almacenado entre 2-8°C el conjugado, después de la dilución permanece estable durante 20 días, llevar a temperatura ambiente antes de su uso.

- PREPARACION DEL REACTIVO DE OPD (orto-fenilendiamina-2 HCl) (ABBOTT)

Llevar los reactivos de OPD a temperatura ambiente (15-30°C) antes de su uso. **NO ABRIR** la botella de tabletas de OPD hasta que ésta haya alcanzado la temperatura ambiente, 5-10 minutos antes del desarrollo de color, preparar la solución de sustrato de OPD .

Transferir a un recipiente adecuado 5 ml de diluyente para OPD por cada tableta a ser disuelta.

NOTA. La solución de sustrato OPD deberá usarse dentro de los 60 minutos siguientes a su preparación y no deberá exponerse a la luz.

Inmediatamente antes de suministrarlo para el desarrollo de color, agitar suavemente para obtener una solución homogénea y eliminar las burbujas de aire.

-PREPARACION DEL TAMPON DE FOSFATOS CONCENTRADO Y TAMPON DE

DILUCION CONCENTRADO (Organon Vironostika) El tampón de fosfatos concentrado y el tampón de dilución concentrado deben llevarse a temperatura ambiente (15-30°C) antes de su uso.

-Diluir el tampón de fosfatos concentrado al 1:25 con agua destilada. Preparar 50 ml de tampón diluido (tampón de lavado) para cada tira de trabajo.

-PREPARACION DEL DILUYENTE DE LAS MUESTRAS (Organon Vironostika)

Diluir 10 ml de tampón de dilución concentrado con 200 ml de agua destilada. Guardando a 2-8°C el tampón de dilución diluido es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el equipo. Preparar el diluyente de las muestras para cada 2 tiras, al diluir 6 ml de suero normal de cabra con 30 ml de tampón de dilución diluido.

- PREPARACION DE LOS CONTROLES, NEGATIVO, POSITIVO DEBIL Y POSITIVO

FUERTE (Organon Vironostika) Reconstituir los controles, negativo, positivo débil y positivo fuerte

lío-filizados, añadir 1 ml de diluyente de la muestra a cada vial, mezclar hasta su completa dilución (aproximadamente 10 minutos) y homogeneizar. Los controles reconstituidos son estables 4 semanas a 2-8°C hasta su fecha de caducidad.

-PREPARACION DE LA SOLUCION DE PEROXIDO DE UREA (Organon Vironostika) Llevar los reactivos a temperatura ambiente. Disolver la tableta de peróxido de urea en 10 ml de agua destilada, homogeneizar antes del uso, la solución puede contener material insoluble, pero esto no afectará al resultado, no es necesaria la filtración, guardando a 2-8°C en la obscuridad, la solución de peróxido de urea es estable un año.

-PREPARACION DE LA SOLUCION DE OPD (dihidrocloruro de orto-fenilendiamina) (Organon Vironostika) Llevar los reactivos a temperatura ambiente. Abrir el vial con las tabletas de OPD, extraer mediante unas pinzas de plástico el número necesario de tabletas y colocarlas en un recipiente limpio, prelavado con agua destilada, usar 2.5 ml de agua destilada por cada tableta. Guardar en la obscuridad hasta su completa disolución (unos 15 minutos).

-PREPARACION DE LA SOLUCION DE SUSTRATO (Organon Vironostika) Preparar la solución de sustrato, añadir 100 µl de solución de peróxido de urea a cada 2.5 ml de solución de OPD. La solución de sustrato debe ser incolora cuando se utilice.

- PREPARACION DE LA SOLUCION DE LAVADO CONCENTRADO (OPD). (Behring). Para cada placa de prueba diluir 20 ml de solución de lavado OPD con agua destilada o desionizada hasta obtener un total de 400 ml.

-PREPARACION DE LA SOLUCION DE CROMOGENO (Behring) Para cada placa de prueba diluir 1.0 ml de cromógeno con 10 ml de tampón/sustrato, en el frasco de plástico adjunto. Después

de su uso, lavar cuidadosamente el frasco con agua destilada.

-PREPARACION DEL AMORTIGUADOR DE LAVADO (DuPont) Llevar los reactivos a temperatura ambiente. Diluir 1 volumen de buffer de lavado 1:20 con 19 volúmenes de agua destilada (agitar), el buffer de lavado diluido es estable a temperatura ambiente hasta 3 meses.

-PREPARACION DEL AMORTIGUADOR DE TRABAJO (DuPont) Llevar los reactivos a temperatura ambiente. Preparar el amortiguador de trabajo justo antes de su uso (1-5 minutos antes de su uso), diluir 1 volumen de amortiguador, con 9 volúmenes de agua destilada (agitar).

-PREPARACION DE LA SOLUCION DE TRABAJO (LECHE) (DuPont) Pesar 1.0 gr de polvo de trabajo para 20 ml de diluyente de buffer, agitar hasta disolver, esto basta para trabajar 2 tiras de nitrocelulosa, si van a ser usadas todas las tiras del estuche, se prepara 9.0 gr del polvo de trabajo con 18 ml de buffer de trabajo.

-PREPARACION DEL CONJUGADO No.1. (DuPont). Llevar los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

1.- La solución de conjugado deberá ser preparada justo antes de su uso (1-5 minutos antes de su uso), con el amortiguador de trabajo.

2.- Para determinar el volumen (en μ l) del amortiguador de trabajo requerido para la dilución de cada conjugado, multiplicar el número de tiras a trabajar por 2,000.

3a.- Para determinar el volumen (en μ l) del conjugado No.1 a diluir, dividir el volumen del amortiguador de trabajo calculado, en el paso 2 por 2,000.

3b.- Para preparar la solución del conjugado No.1. Adicionar el volumen calculado del conjugado del paso 3a, a el volumen del amortiguador de trabajo del paso 2, agitar por inversión, regresar el

conjugado No.1 a una temperatura de 2-8°C inmediatamente después de su uso.

-PREPARACION DEL CONJUGADO No.2 (DuPont)

4a.- Para determinar el volumen (en μ l) del conjugado No.2, a diluir, dividir el volumen del amortiguador de trabajo, calculado en el paso 2 por 1,000.

4b.- Para preparar la solución del conjugado No.2, adicionar el volumen calculado del conjugado del paso 4a, a el volumen del amortiguador de trabajo del paso 2, agitar por inversión. Regresar el conjugado No.2 a una temperatura de 2-8°C inmediatamente después de su uso.

-PREPARACION DEL SUSTRATO A Y B (DuPont) Preparar justo antes de su uso. (1-5 minutos antes de su uso).

Preparar la solución de sustrato de trabajo A y B, adicionando igual volumen del sustrato A y sustrato B, **AGITAR BIEN.**

Preparar según el número de tiras de nitrocelulosa a trabajar, para 1 tira, ocupar 1.0 ml de sustrato A y 1.0 ml de sustrato B.