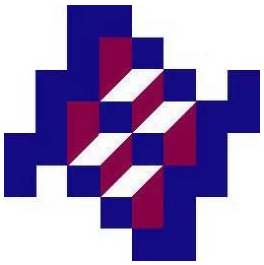


INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MEXICO

Valores predictivos de pruebas serológicas para infecciones recientes de VIH

M.C. ELI FERNANDA KARATZAS DELGADO

Generación 2014-2016

Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias en Enfermedades Infecciosas

Director de tesis: Dr. Miguel Sánchez Alemán

Asesora de tesis Dra. Verónica Ruiz González

Asesor de tesis: Dr. Hugo López-Gatell Ramírez

Cuernavaca, Morelos., Agosto 2016.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por su amor, esfuerzos, apoyo incondicional y por impulsarme a dar siempre lo mejor de mí. Cada uno de mis logros, también es tuyo, te amo.

A mi padre σε αγαπώ.

A mi familia, por su cariño y enseñarme a luchar por lo que se quiere, los amo. A mis compañeros de vida, Vero y Fabi, gracias por siempre estar siempre a mi lado.

Al Dr. Miguel Sánchez Alemán por aceptarme en su laboratorio, sus enseñanzas y el arduo trabajo de transmitirse sus diversos conocimientos. Al Dr. Hugo López-Gatell Ramírez por aceptarme en este proyecto, sus invaluables conocimientos y sus consejos. A la Dra. Verónica Ruíz González por aceptar formar parte de este proyecto, sus conocimientos y atender mis dudas. Al Dr. Carlos J. Conde González por ser mi sinodal-lector y contar con sus valiosas aportaciones.

A Santa García Cisneros por su capacitación, compartirme sus conocimientos e infinita paciencia. A María Olamendi Portugal y Obdulia Escobar por su apoyo y consejos.

A mis amigos, por su cariño, palabras de aliento y animarme a siempre seguir adelante.

A Carlos, Alonso y Eduardo, por compartir esta aventura de vida conmigo, tantas horas de risas y alegrías, su apoyo siempre que lo necesite y cariño incondicional. Mis niños, ha sido un privilegio compartir esta experiencia con ustedes!

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada durante la maestría, número de CVU 402983.

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación, del Instituto Nacional de Salud Pública, el día 30 de octubre del 2015, con una vigencia hasta el 29 de octubre del 2016.

Este trabajo fue aceptado y presentado en el **XLI Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica.** Monterrey, Nuevo León del 25 al 28 de mayo del 2016, en la modalidad de trabajo libre con el nombre “Utilidad de sangre seca en papel filtro para la detección de *T. pallidum*, VHS-2 e infecciones recientes de VIH”.

ABREVIATURAS

Sida	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RITA	Recent Infection Testing Algorithm
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
CDC	Center for Disease Control
NIAID	Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas
VIS	Virus de la Inmunodeficiencia en Simios
Gag	Antígeno grupo específico
ENSA	Encuesta Nacional de Salud
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA
DBS	Dried blood spots
DSS	Dried serum spots
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo
CEC	Clínica Especializada Condesa
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
PBS	Phospate-buffered saline
CISEI	Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas
ODn	Densidad óptica normalizada
VP	Verdaderos Positivos
FP	Falsos positivos
FN	Falsos negativos
VN	Verdaderos negativos
ROC	Curvas dependientes del Operador
CEPHIA	Consortium for the Evaluation and Performance of HIV Incidence Assays

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1 Estructura del virión de VIH …16
Cuadro 1 CDC Clasificación sistémica para adultos y adolescentes infectados con VIH …26
Cuadro 2 Comparación ¨Pruebas *Sedia™ BED HIV-1 Incidence EIA* and *Sedia™ HIV-1 LAg-Avidity EIA* …32
Cuadro 3 Clasificación del coeficiente kappa …48
Cuadro 4 Categorías diagnósticas …49
Figura 2 Figura 2. Correlación de DBS tarjeta, DBS spots y suero para VHS2…51
Cuadro 5 Resultados de muestras para detección contra anticuerpos de *Treponema pallidum* con diferentes diluciones …52
Figura 3 Cuantificación de proteínas con diferentes concentraciones de muestra. DBS tarjeta y DBS spots …53
Figura 4 Correlación de DBS y suero con BED-CEIA …54
Cuadro 6 Concordancia entre suero y DBS BED-CEIA …55
Cuadro 7 Variación intraensayo de controles y calibrador en ensayos independientes …55
Cuadro 8 Coeficiente de variación intraensayo y ejemplo de corrección aplicada en una muestra …56
Cuadro 9 Variación interensayo de controles y calibrador en ensayos independientes …57
Cuadro 10 Valores de DBS con respecto a suero de BED-CEIA …57
Figura 5 Correlación de DBS y suero con LAg-avidity …58
Cuadro 11 Concordancia entre suero y DBS, LAg-avidity. …59
Cuadro 12 Variación intraensayo de controles y calibrador en ensayos independientes …59
Cuadro 13 Variación interensayo de controles y calibrador en ensayos independientes …60
Cuadro 14 Valores de DBS con respecto a suero de BED-CEIA …60
Cuadro 15 Concordancia entre infección reciente por expediente y suero, BED-CEIA …61
Cuadro 16 Valores de suero con respecto a estándar de oro, BED-CEIA …62
Cuadro 17 Concordancia entre infección reciente por expediente y suero, LAg-avidity …62
Cuadro 18 Valores de suero con respecto a estándar de oro, LAg-avidit …63
Cuadro 19 Concordancia entre infección reciente por expediente y DBS, BED-CEIA …63
Cuadro 20 Valores de DBS con respecto a estándar de oro, BED-CEIA …64
Cuadro 21 Concordancia entre infección reciente por expediente y DBS, LAg-avidity …64
Cuadro 22 Valores de DBS con respecto a estándar de oro, BED-CEIA …66
Figura 6 Curva ROC muestra de suero, prueba BED-CEIA …67
Figura 7 Curva ROC muestra DBS, prueba BED-CEIA …68
Figura 8 Curva ROC muestra suero, prueba LAg-avidity …69
Figura 9 Figura 9. Curva ROC muestra DBS, prueba LAg-avidity …70

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Páginas
1 Introducción	…9
2 Planteamiento del problema	…13
3 Marco conceptual	…14
3.1 Descubrimiento del virus del Sida	…14
3.2 Estructura viral	…15
3.3 Organización genómica	…17
3.4 Ciclo de vida del retrovirus	…18
3.5 Epidemiología del VIH	…21
3.6 Historia natural de la enfermedad	…24
3.7 Diagnóstico de VIH	…26
3.8 Tratamiento	…27
3.9 Pruebas serológicas en infección reciente	…28
3.10 Papel filtro en pruebas serológicas	…33
4 Justificación	…37
5 Objetivos	…39
5.1 Objetivo general	…39
5.2 Objetivos específicos	…39
6 Material y Métodos	…40
6.1 Validación de la reconstitución de DBS a partir de muestras de suero	…41
6.2 Desarrollo de las pruebas de infección reciente	…45
6.3 Análisis estadístico	…48
7 Resultados	…51
8 Discusión	…71
9 Conclusiones	…77
10 Bibliografía	…78
11 Anexos	…85

RESUMEN

El diagnóstico poblacional de la incidencia de VIH se puede realizar a través de diseños transversales que emplean métodos serológicos que determinan infección reciente por VIH. **Objetivo.** Determinar el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de dos pruebas serológicos (BED-CEIA y LAg-avidity) para determinar infecciones recientes de VIH en una muestra de hombres que tienen sexo con hombres (HSH). Se llevó a cabo a partir de una base de datos y de un banco de 224 muestras de suero de la Clínica Especializada Condesa del Distrito Federal. Dentro de los objetivos específicos se encontraron la evaluación de la correlación entre las muestras de suero y DBS (dried blood spots) en las dos pruebas serológicas, para validar este proceso se realizaron varios análisis en un banco de muestras con el que contaba el laboratorio de infecciones de transmisión sexual del CISEI, en las cuales ya se había realizado detección de anticuerpos de VIH, VHS-2 y *T. pallidum.* **Material y métodos***.* Se experimentó la obtención de sangre completa a partir de las muestras de suero para obtener DBS, con eritrocitos de un sujeto control negativo para estos anticuerpos, se validó la forma de papel filtro y la cantidad utilizada con 10,15 y 20 µl en BDS spot y DBS tarjeta de papel filtro completa. Para corroborar la eficiencia de este proceso, se les realizó una prueba de ELISA para virus del herpes simplex tipo 2 (VHS-2), una prueba de aglutinación de partículas para detección de *Treponema pallidum* y se midió la concentración de proteínas. **Resultados.** Se obtuvo una correlación del 100% entre las pruebas de ELISA anticuerpos HVS-2 y de *Treponema pallidum.* Se identificó una adecuada concentración de proteínas desde las muestras donde se colocaron 10 µl en DBS tarjeta y por cuestiones de bioseguridad se decidió trabajar con las muestras de papel filtro completo. A las muestras que se les realizaron las pruebas serológicas de infección reciente de VIH, se les aplicaron las pruebas de diferencia de proporciones (BED-CEIA) y de avidez (LAg-avidity), tomando como estándar la incidencia en el estudio de cohorte de pacientes de esta clínica. Se obtuvo una muy buena correlación en los resultados en las muestras de suero y DBS para la prueba BED-CEA y buena para la prueba de LAg-avidity. Se identificó una concordancia para la prueba BED-CEIA del 99.55% de las 223 muestras que fueron clasificadas correctamente como infección reciente entre el suero y los dried blood spots, para la prueba LAg-avidity fue del 96.42% de las 216 muestras con la misma categoría. Para la prueba BED.CEIA el valor predictivo positivo fue 100%, el valor predictivo negativo de 98%, la sensibilidad del 99% y especificidad del 100%, y para LAg-avidity el valor predictivo positivo fue de 96.02%, el valor predictivo negativo de 97%, una sensibilidad del 98.60% y especificidad del 92.20%. Se realizarán curvas ROC observando una sensibilidad arriba del 90% en ambas pruebas, la curva con mayor área bajo la curva fue la de LAg-avidity suero con 0.969. **Conclusiones**. Los valores predictivos positivos y la especificidad en LAg-avidity son mayores, sin embargo en esta prueba se identificó un mayor coeficiente de variación intra e interensayo en las placas. En las Curvas ROC la sensibilidad observada fue muy buena para ambas pruebas, pero la especificidad se puede mejorar al crear zonas grises de los puntos de corte, para la prueba de BED-CEIA, la propuesta es crear esta zona para que las resultados obtenidos sean confirmada por la prueba LAg-avidity, para esta última, la creación de su zona gris es para que esos resultados sean confirmados por pruebas moleculares.

1 Introducción

El Programa Conjunto de Naciones Unidas para VIH/SIDA (ONUSIDA) estimó en 2015 que el número global de personas que vivían con el VIH eran 36.7 (34-39.8) millones (1). A 32 años desde el inicio de la epidemia de VIH en México ésta continúa siendo de tipo concentrada con prevalencia menor a 1% en la población centinela de bajo riesgo (como mujeres embarazadas detectadas en servicios de salud generales), prevalencias superiores a 5% en grupos específicos de alto riesgo y ser primordialmente de transmisión sexual (2) (3) (4).

Las estimaciones de la prevalencia e incidencia de VIH han sido ampliamente utilizadas para conocer el estado epidemiológico en una población, así como para evaluar el impacto de las intervenciones de salud (5). La vigilancia primaria de VIH utiliza medidas de prevalencia de VIH, que registran de manera histórica y no reciente la trayectoria de una epidemia. Si la mortalidad es comparable, diferentes magnitudes de prevalencia entre subpoblaciones indirectamente reflejan la magnitud del riesgo acumulado en periodos previos, pero no permiten evaluar (6).

La incidencia de VIH es el índice cuantitativo más importante para evaluar el riesgo de infección. La incidencia se puede utilizar para evaluar la efectividad de las intervenciones preventivas en una población y monitorear cambios en los patrones de transmisión de la infección. Actualmente existen tres enfoques metodológicos para determinar la incidencia de VIH en una población: 1. estimarla directamente en estudios de cohorte, 2. inferirla a partir de la prevalencia y 3. estimarla a través de pruebas para infección reciente en estudios transversales (7).

Los estudios de cohorte son el estándar de oro para estimar directamente la incidencia de VIH. Este método se usa para evaluar el curso de una transmisión, la epidemia, la planeación de programas de salud, identificar grupos de riesgo, evaluar el impacto de las medidas de prevención, identificar poblaciones para su reclutamiento en ensayos clínicos y para realizar intervenciones que previenen la

infección o tratan infecciones de manera temprana (8) (9). El seguimiento de una cohorte requiere un periodo de mayor a dos años y con al menos dos mediciones en el tiempo y un tamaño de muestra generalmente grande, cuando la incidencia esperada es moderada o baja. Además, los estudios longitudinales de VIH presentan dificultades logísticas, son costosos y requieren consejería previa a cada toma de muestra (6) (8) (10) (11) (12).

En la estimación de la incidencia por modelación de la prevalencia, se asume que los cambios de prevalencia observados en diversos estudios transversales en la población con VIH, son el efecto neto de la incidencia, relacionado con las muertes y cambios de migración en esta población. Aquí las estimaciones de la incidencia dependen de que se tenga disponible en una región, la información sobre mortalidad y migración de las personas que viven con VIH. Las estimaciones de prevalencia requieren una vigilancia continua en clínicas o centros de atención para estos pacientes, en lugar de limitarse a muestreos en diferentes momentos del tiempo, por lo que la incidencia puede estimarse con mayor frecuencia en la población y no refleja tasa de transmisión directa de VIH en una población. (10)

Debido a las desventajas de estos estudios, se puede estimar la incidencia de VIH a través del concepto de infección reciente. Éste se entiende como el tiempo que pasa después de que una persona se infecte con VIH y se detecten ciertos biomarcadores (5). Se considera infección reciente un periodo de hasta un año posterior a la adquisición de la infección (10). La duración de la infección reciente se puede definir en términos cronológicos o biológicos con base en el cambio de estado de biomarcadores entre el inicio de la infección y momentos posteriores (10). Se han desarrollado métodos de laboratorio capaces de detectar de manera rápida y con una sola toma de muestra, la infección reciente (13) .

Existen varios métodos de detección individual de infección reciente de VIH que incluyen: métodos clínicos, detección de ácidos nucleicos y ensayos serológicos. Los métodos clínicos se basan en deducir el tiempo probable de infección al

identificar la presencia de criterios indicadores individuales de la enfermedad por VIH como la trayectoria temporal inicial de la concentración plasmática de RNA de VIH (carga viral) en ausencia de tratamiento, la cuenta de linfocitos CD4+, la presencia de infecciones oportunistas y otras condiciones definitorias del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Sida).

Los métodos de ácidos nucleicos incluyen la secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la detección de viriones en cultivo. Los métodos serológicos se basan en la detectar anticuerpos y antígenos específicos para VIH en el suero (4). Los métodos se interpretan a la luz del principio de que las concentraciones séricas de anticuerpos contra VIH o su avidez por antígenos específicos incrementan monotónicamente con el tiempo desde la infección. Por tanto, la concentración sérica de anticuerpos es indetectable en personas con infección recientemente adquirida. (7).

Para llegar a un diagnóstico más certero de infección reciente, se han implementado algoritmos que combinan métodos de laboratorio e indicadores clínicos. Éstos algoritmos, que se conocen por sus siglas en inglés como RITA (Recent Infection testing algorithm), incluyen una o más pruebas de laboratorio e información clínica tomando en cuenta la historia de infección de VIH, diagnóstico de Sida, uso de terapia antirretroviral y el conteo de linfocitos T CD4+ (10) (14). Estos aspectos clínicos se estudian porque en el caso de la terapia con antirretrovirales, ésta conduce a una clasificación errónea de las infecciones de larga duración, diagnosticándolas como recientes. El mecanismo exacto no ha sido descrito, pero es muy probable que la supresión de la replicación viral llega a tal grado que el estímulo crónico de la respuesta inmune humoral es eliminado, este efecto es más pronunciado durante los primeros meses posteriores al inicio con medicamentos antirretrovirales. En el caso del conteo de linfocitos CD4, la falla del sistema inmune está asociado con el avance de la infección por VIH, que a su vez está asociado con la disminución de los niveles de anticuerpos y esto se espera que impacte los métodos de detección que dependan primariamente de la cuantificación de anticuerpos. En las pruebas cuyo fundamento es la avidez, lo esperado es que el

conteo de linfocitos CD4 no se vea tan afectado, como en las pruebas donde se lleva a cabo la cuantificación de anticuerpos (14).

La combinación estructurada de múltiples pruebas, principalmente las que evalúan diferentes características de la evolución de los anticuerpos en el tiempo, como el título de anticuerpos y el grado de avidez, incrementan la especificidad y el valor predictivo para detectar infección reciente (14).

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La incidencia refleja la tasa directa de la transmisión actual de una enfermedad y permite evaluar el impacto de las medidas preventivas que se llevan a cabo en una población. El estándar de oro de la incidencia en VIH son los estudios de cohorte, cuyas desventajas son tener que realizar un seguimiento prolongado de una muestra grande, que resulta costoso y puede presentar limitantes humanas y de recursos, por tal motivo surge la alternativa de medir la incidencia a través de infecciones recientes con estudios transversales (10) (15) (14) (11). Una infección reciente de VIH es el estado que comienza en el momento cuando el proceso biológico de la infección por VIH inicia, su duración puede estar definida en términos cronológicos y biológicos. Para ser medida el términos biológicos se requiere de un biomarcador presente al inicio de la infección y que después desaparece o viceversa, variando su duración entre individuos.

La detección de infección reciente se puede realizar a través de ensayos para serológicos que son por cambios de sensibilidad, diferencia de proporciones y avidez (10) (16). Las limitantes de estas pruebas son que pacientes con infección prolongada, inmunocompromiso severo o con tratamiento antirretroviral, pueden ser clasificados erróneamente como infección reciente (10) (16). Por lo tanto se desea conocer ¿cuál es el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de dos pruebas serológicas para infecciones recientes de VIH en una población mexicana de hombres que tienen sexo con hombres?

3 MARCO CONCEPTUAL

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus no oncogénico y agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Sida) (17). Los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2) son miembros del género *Lentiviridae y* pertenecen a la familia *Retroviridae*. Son conocidos como retrovirus debido a que su genoma se transcribe de RNA a DNA dentro de la célula a través de la enzima viral transcriptasa reversa y posteriormente este DNA penetrará el núcleo para integrarse al cromosoma celular (18).

3. 1 DESCUBRIMIENTO DEL VIRUS DEL SIDA

En 1981 se registró por primera vez un síndrome clínico caracterizado por inmunodeficiencia profunda que atacaba a varones homosexuales, recibiendo el nombre de Sida. Los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EUA informaron sobre una prevalencia atípicamente alta de neumonía por *Penumocystis carinii* (actualmente llamado *P. jirovecci*), en varones homosexuales jóvenes previamente sanos. Al mismo tiempo en las ciudades de San Francisco y Nueva York se identificaron casos en población con la misma edad y orientación sexual que habían desarrollado un cáncer mesenquimal infrecuente, el sarcoma de Kaposi (19).

En 1983 en el Instituto Pasteur de Francia se aisló por primera vez un retrovirus (VIH-1) en un caso de SIDA, por los investigadores Luc Montagnier y Barré-Sinoussi, que posteriormente fue confirmado en Estados Unidos por Robert Gallo del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID).

Poco tiempo después a la identificación del VIH-1, un segundo virus fue aislado en pacientes con SIDA que residían en África Occidental, en Cabo Verde, Senegal, Gambia, Costa de Marfil y Guinea-Bissau. A este nuevo virus se le realizaron

análisis de secuencias y de clonación; se pudo identificar que difería en más del 55% del VIH-1 y que era antigénicamente distinto, por lo que se le designó como un nuevo tipo, VIH-2 (18). El VIH-2 presenta homología evolutiva con el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), que se circunscribe al África subsahariana y produce una infección menos agresiva (20).

3. 2 ESTRUCTURA VIRAL

El virión del VIH es una partícula esférica, mide cerca de 100 a 120 nm de diámetro, y posee una envoltura externa de lípidos (18) (21). Dentro de la envoltura se localizan las glicoproteínas (gp) Env (formada por 72 filamentos), codificadas por el gen viral *env.* Las proteínas Env son complejos triméricos de los heterodímeros de gp120 - gp141. La proteína gp120 corresponde a la protuberancia externa de la glicoproteína y contiene los sitios para el acoplamiento de los receptores celulares y los principales dominios de anticuerpos neutralizantes. La porción transmembranal (gp141) une la protuberancia con la envoltura lipídica del virus, su parte externa también se ha reportado como sensible a anticuerpos neutralizantes (18) (21) (19).

La superficie interna de la envoltura lipídica está cubierta por proteína de matriz (p17) y abundan proteínas celulares como los antígenos de clase I y II del MHC. La envoltura lipídica envuelve una cubierta icosaédrica de proteína (p17) que contiene un núcleo proteínico con aspecto de vaso o cono (proteínas p24, p7 y p9) compuesto por dos moléculas de RNAs en forma de ribonucleoproteinas (19).
Las proteínas de la envoltura se derivan de una glicoproteína precursora de 160 kDa, que se escinde dentro de la célula en una proteína superficial externa de la envoltura gp120 y una proteína transmembranal gp41. Estas proteínas se transportan a la superficie de la célula, donde la porción central y el amino terminal de gp41 se expresan en el exterior del virión, parte que la cola larga citoplásmica de gp41 se necesita para la incorporación de la glucoproteína de la envoltura VIH-1 en los viriones (18).

Por debajo de la envoltura viral se encuentra la matriz proteínica viral, que deriva de los precursores proteínicos Gag (antígeno grupo específico) producto del gen *gag* (21). Las tres proteínas estructurales de la Gag son: la matriz (MA, p17), CA (p24) y la nucleocápside (NC, p7) (18). La matriz MA forma el cascarón interno en la partícula justo por debajo de la membrana viral, la CA forma el centro cónico que incluye el RNA genómico viral y la nucleocápside interacciona recíprocamente con el RNA viral dentro de la cápside (21). La nucleocapside está compuesta por dos proteínas que derivan del precursor Gag; la capside proteica y la nucleocapisde proteica. La capside rodea a la nucleocapside, que se encuentra adherida al RNA en el core; este último tiene una configuración de cono (21). Figura 1. Estructura del virión de VIH. .

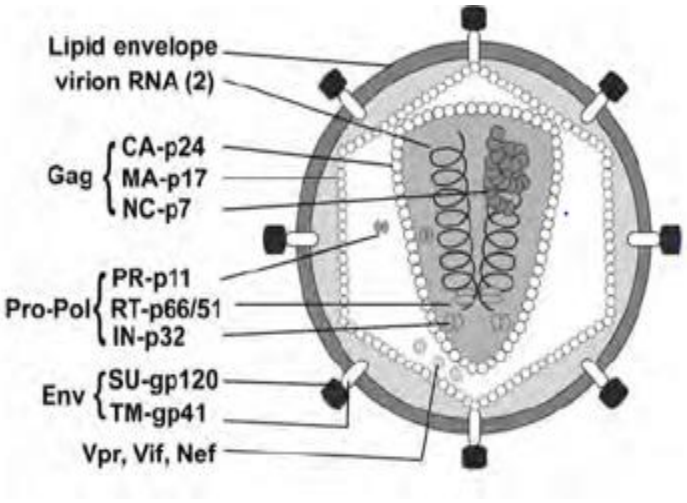


Figura 1. Holmes K, et al. Sexually Transmitted Diseases. 4a ed. Vols. p.326-331. USA: Mc Graw Hill; 2008.

Las enzimas proteasas virales, la transcriptasa reversa y la integrasas son codificadas por el gen *pol.* Existe una proteína accesoria Vpr y otras pequeñas cantidades de dos otras proteínas accesorias más, Vif y Nef, que también se encuentran incorporadas a los viriones (21).

La presencia de todas estas proteínas virales dentro del virión sugiere que desempeñan un papel durante los acontecimientos tempranos de la infección de VIH, porque son indispensables para replicación viral, de igual modo se han detectado ciertas proteínas del citoesqueleto como la emerina, actina, ezrina, moesina y coflina. (21) (22) La emerina es necesaria para la replicación del HIV al ayudar en la interacción del DNAc viral con la cromatina y su integración subsiguiente. La proteína 70 de choque térmico (hsp70) también tiene un papel dentro de la membrana de la membrana del VIH-1 para mantenerlos íntegros (21).

3.3 ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El virión contiene en su interior dos hebras idénticas de RNA condensado unido de manera no covalente en la nucleocápside, junto con la maquinaria enzimática que le permite su paso a DNA en el citoplasma de la célula hospedero y la posterior integración al genoma de la célula. Es un virus envuelto, cuya envoltura deriva de la membrana celular que adquiere de la célula del hospedero durante la adhesión (21) (20) (19).

El tamaño genómico del VIH mide alrededor de 10 kb con sitios de lectura abierto que codifican para varias proteínas virales (18). La longitud del RNA monomérico para los retrovirus va desde 7000 nucléotidos para los retrovirus simples hasta 10,000 nucléotidos para los retrovirus complejos como el VIH-1 (21).

Todos los retrovirus codifican para cuatro marcos de lectura primarios de replicación: *pro, pol, gag* y *env.* El gen *pol* codifica la transcriptasa inversa y la integrasa, que reintegra el genoma proviral al DNA celular; el gen *gag* codifica las proteínas estructurales de la cápside; el gen *pro* codifica la proteasa responsable del fraccionamiento después de que el virus ha sido liberado de la célula. El genoma del VIH-1 codifica seis genes accesorios: *vif, vpr, tat, rev, vpu* y *nef,* que son importantes en la patogenia de la enfermedad *in vitro* y regulan la expresión viral (21).

La proteína Tat es una proteína de replicación de fase temprana, funciona en transactivación, mientras que un producto de gen viral correspondiente (*tat*) está implicado en la activación transcripcional de otros genes virales, esta acción puede explicar parte de la naturaleza virulenta de las infecciones por este virus. La proteína Rev funciona para la expresión de las proteínas estructurales virales, facilita la salida de transcritos virales no unidas al núcleo. Vpr es empacado en los viriones y participa en la translocación nuclear del complejo de preintegración, facilita la producción del virus atacando a células que se encuentran en la fase G2 del ciclo celular (21).

La proteía Vpu colabora en la translocación de Env a las membranas celulares, al degradar a CD4 intracelulares. La proteína Vif es empacada en los viriones y juega un papel importante en el proceso de transcripción reversa durante las siguientes fases de la replicación, ya que su actividad es dependiente la producción de viriones por las células. Dentro de las funciones de la proteína Nef se encuentra la habilidad de modular los CD4 de la superficie de la célula y marcarlos para su degradación lisosomal, también interrumpe la respuesta inmune al modular los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad, clase I y II, los receptores T y otros efectores moleculares de la respuesta inmune e interactúa con las cinasas p21 para promover la replicación viral (21).

3.4 CICLO DE REPLICACION DEL RETROVIRUS

Los pasos de la replicación del virus VIH son: fijación o adsorción, penetración, transcripción reversa, importación nuclear e integración del DNA viral, transcripción del DNA proviral, exportación nuclear y procesamiento del RNA, ensamblaje, gemación, liberación, procesamiento proteolítico y maduración del virión (21).
A continuación se indica lo que sucede en cada uno de los pasos de la replicación:

Fijación y penetración

El proceso de la infección inicia cuando el retrovirus interactúa con el receptor molecular CD4 en la superficie de la célula del hospedero, que identifica a los linfocitos cooperadores, macrófagos y otras células del linaje de los monocitos. Este proceso esta mediado por las espículas de las proteínas Env (21). La fijación a la proteína CD4 no es suficiente para la infección, por lo que en el momento de la penetración se requiere una segunda molécula correceptora, CCR5 o CXCR4. La molécula CCR5 se presenta tanto en linfocitos CD4+ como a macrófagos, mientras que CXCR4 sólo en linfocitos CD4+ (21).

Existen otras vías que se han demostrado *in vivo* de que el VIH-1 puede utilizar otros mecanismos para adherirse a sus células blanco, como cuando la unidad gp-120 de Env puede unirse a las células dendríticas y de este modo puede pasar eficientemente a las células CD4 por transfección (21).

Síntesis viral de DNA

La transcriptasa reversa dirige la síntesis de una cadena de DNA a partir del RNA del hospedero de cadena positiva como cebador y el RNA viral como plantilla. Por lo tanto la acción enzimática de la RNAasa viral remueve el RNA viral original (19).

Se forma el complejo de preintegración, que está compuesto por la unión del DNA recién sintetizado con las proteínas del virus progenitor. Este complejo puede ser transportado de manera activa al núcleo (21). La integración del DNA viral al DNA de la célula hospedero, esta mediada por la proteína denominada integrasa viral, para que este paso sea eficiente se requiere al menos un factor del hospedero como el factor de crecimiento epitelial (21).

El DNA integrado es transcrito en RNA por la RNA polimerasa II del hospedero y el transcrito del RNA posee las características del RNAm celular (21). El RNA recién

sintetizado puede tomar uno de 4 destinos finales para completar el ciclo de replicación (21):

a) Puede sufrir empalme en varias ocasiones para remover intrones y generar transcritos pequeños que codifiquen *tat, nef* o *rev.*
b) Puede sufrir empalme en una sola ocasión, en donde se le remueve un solo intrón que abarca los genes gag, pol y pro, para expresar *vpu, vpr, env* o *vif.*
c) Puede que no pase por el proceso de empalme y ser utilizado como RNAm para *pro, pol* y *gag.*
d) No sufrir empalme y ser usado como genoma de RNA en el ensamblaje de nuevos viriones.

Ensamblaje y gemación

La proteína Gag y los precursores de Gag-Pro_pol se multimerizan en sitios de ensamblaje, incorporan otras proteínas virales y celulares y ensamblan el genoma de RNA viral para completar el proceso (21). Las proteínas de tipo Env que han sido recién sintetizadas utilizan la maquinaria celular de tipo secretorio para su tráfico celular. La gp 160 es translocada al retículo endoplásmico durante su síntesis, es glicosilada y forma un homotrimero, posteriormente es transportado al aparato de Golgi donde es adherida por una proteasa para generar los heterodimeros de gp120 y gp41, posteriormente se transporta a la superficie de la membrana celular (21). Otra proteína accesoria que es empaquetada en el proceso de ensamblaje es la Vpr, mediante una interacción con Gag (21). Los retrovirus redirigen la formación de vesículas que geman en cuerpos multivesiculares en las células hospedero, para el ensamblaje en la membrana plasmática de las células del hospedero. Este proceso también se puede llevar a cabo de manera intracelular, para que las vesículas sean liberadas el espacio extracelular a través de la vía exosomas(19).

3.5 EPIDEMIOLOGÍA DEL VIH

ONUSIDA indica que en 2014 el número global de personas que vivían con VIH era de 36.7 millones (intervalo de confianza [IC] 95%: 34.0 – 39.8). En este mismo año se notificaron 2.1 millones (1.8 – 2.4) de nuevas infecciones por el VIH a nivel mundial, lo que representa una disminución del 6% respecto a 2010, cuando las cifras alcanzaban los 2.2 millones (2.0 – 2.5). El número de personas que fallecieron por causas relacionadas con el Sida también disminuyó de 1.1 millones (0.94 – 1.3) en este año, comparado a 2 millones (1.7 – 2.3) en 2012 (1).

En América Latina en el 2015, 2 millones (1.7 – 2.3) de personas vivían con el VIH, en comparación a los 1.2 millones (0.97 – 1.5) en 2001. Aproximadamente 100,000 personas (86,000 – 120,000) contrajeron el VIH en este mismo año, las cifras de nuevas infecciones no sufrieron ningún cambio entre 2010 y 2015. El número de muertes por causas relacionadas con el Sida fue de 50,000 (41,000 – 59,000) , que es 18% menor a lo estimado en 2010.(1) (23).

ONUSIDA refiere que la epidemia de México se encuentra concentrada, la cual afecta principalmente a poblaciones claves: hombres que tienen sexo con hombres, usuarios de drogas inyectadas, trabajadores y trabajadoras del sexo comercial, personas transgénero, transexuales y travestis (2). Estimaciones de ONUSIDA-Censida indicaron que a finales del 2013 existían 180 mil personas viviendo con VIH y Sida ($IC_{95\%}$:140,000 – 230,000). La prevalencia de VIH en la población de 15 a 49 años fue de 0.2%, la cual es consideraba baja y su tendencia se ha estabilizado en los últimos diez años (2). En la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000 la seroprevalencia estimada de anticuerpos contra VIH-1 para la población adulta (mayor de 20 años) fue 0.25% ($IC_{95\%}$: 0.14-0.45) y correspondió a 130,138 adultos mexicanos infectados ($IC_{95\%}$: 72,998-231,889) (24). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012 estimó una seroprevalencia de VIH en la población mexicana de 15 a 49 años de 0.15%, con una razón entre hombres y mujeres de 3.4 hombres con VIH por cada mujer, lo que representaría 180,000 casos en todo el país (3).

En el 2013 se estimaron 9,300 nuevas infecciones por VIH ($IC_{95\%}$ 6,000-15,000), cifra que ha ido disminuyendo, ya que en el 2005 se presentó un valor máximo de 15 mil nuevas infecciones (2). En nuestro país la incidencia anual media de Sida en el periodo de 1983-2014 fue de 186.7 casos por cada 100 mil habitantes (25). Según la vía de transmisión de VIH el 95.1% fue vía sexual, el 2.0% vía perinatal y el 2.9% vía sanguínea (26),(27). Desde 2007 se logró el acceso gratuito a la terapia antirretroviral contra el VIH a la población con seguridad social y, desde 2011 a toda la población mexicana que no contara con un servicio de seguridad social (28). El costo promedio anual en tratamiento por paciente, que invirtió la Secretaria de Salud en este mismo año fue de $44,997 pesos (29). A finales de 2013 se estimó que 89,410 personas estaban recibiendo terapia antirretroviral a nivel nacional. (30).

Transmisión

La concentración de células infectadas por VIH y la concentración del virus en los diferentes fluidos corporales varía, observando los valores mayores en plasma sanguíneo, monocitos, líquido cefalorraquídeo, semen y secreciones vaginales (27), por lo que la eficiencia de la vía de transmisión es función de la concentración local de VIH en el fluido, célula o tejido, pero la frecuencia o proporción de casos transmitidos por cierta vía es además función de la frecuencia de exposición. Los mecanismos de transmisión más comunes de la infección por VIH son transmisión sexual, vertical o perinatal y parenteral (27).

Transmisión sexual. Como factores de riesgo encontramos la coinfección con otras infecciones de transmisión sexual, úlceras genitales, ausencia de circuncisión en los varones, coito durante la menstruación y carga viral elevada (27). En el mundo la vía más frecuente de transmisión es a través de relaciones heterosexuales sin protección, en algunos países la vía más frecuente es la de hombres que tienen sexo con hombres sin protección. En ambos casos el riesgo de infección está

relacionado con el número de parejas sexuales, particularmente las concurrentes. Las parejas receptivas se encuentran en mayor riesgo de contraer el virus (20) (27).

Transmisión vertical o perinatal. Este tipo de transmisión puede ocurrir de manera transplacentaria en el embarazo, principalmente en el tercer trimestre o en el momento que el feto atraviesa el canal del parto como consecuencia de la exposición del tracto genital infectado, o mediante la lactancia materna, por lo que está contraindicada (20) (27). En los últimos años se ha logrado disminuir la transmisión materno fetal a menos de 1%, si la paciente es tratada con triple terapia viral durante el embarazo, con zidovudina intravenosa durante el parto, o por realización de cesárea en aquellas pacientes donde la carga viral no está controlada y el tratamiento del recién nacido con zidovudina en las primeras semanas desde el nacimiento (20) (27).

Transmisión parenteral. En 1985 en Estados Unidos se realizaron por primera vez pruebas para anticuerpos de VIH en sangre de donadores, ya que las personas que recibían sangre se encontraban en elevado riesgo de contraer esta enfermedad, principalmente hemofílicos que recibían el factor VIII con sangre infectada. Gracias a la implementación de programas de control de esterilización y normatividad para transfusiones, este tipo de transmisión ha disminuido favorablemente (20) (27). Actualmente la vía más común en este modo de transmisión es el uso de drogas intravenosas, a través del uso compartido de agujas sin esterilizar y otro tipo de parafernalia de drogas inyectadas (20).

Receptores celulares y entrada viral

El VIH-1 infecta diferentes células del organismo, sus blancos principales son los macrófagos, linfocitos CD4, células de sostén del sistema nervioso central, neuronas, células entrerocromafines del intestino, precursores de médula ósea y células de Langerhans (31) (32). La entrada del virus a la célula depende la

identificación con un receptor específico, como es el caso de la molécula CD4, así como los correceptores CCR5 en macrófagos y CXCR4 en linfocitos T (33). El contacto del virión con el receptor y correceptor, origina cambios en la estructura viral, a nivel de las glicoproteínas de superficie, permitiendo así la internalización y fusión de la membrana del virus (32).

3.6 HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

Las condiciones patológicas asociadas a la infección por VIH-1 se distribuyen en 3 diferentes fases: aguda, asintomática y Sida.

Fase aguda. Ocurre en los primeros días posteriores a la infección, el virus se replica en grandes cantidades en los linfocitos CD4+ en los ganglios linfáticos. La enfermedad aguda puede ser asintomática o manifestarse con síndrome febril y malestar general, similar a influenza. El periodo de incubación dura 3 a 4 semanas y existe el acmé de la viremia suele ocurrir entre seis y ocho semanas posteriores a la infección (20) (27). En esta etapa se pueden encontrar alrededor de 5×10^3 viriones o 1×10^7 copias de RNA viral por ml de plasma, por lo que resulta en un periodo de alta infectividad. Durante esta fase el conteo de linfocitos CD4+ disminuye transitoriamente. El virus presenta mayor tropismo por los macrófagos que por los linfocitos, pero se desconoce la causa de esta selectividad (27). También existe una hipergammaglobulinemia que actúa reteniendo al virus a nivel de los ganglios linfáticos; principalmente por células dendríticas foliculares (20).

Fase temprana o asintomática. Después de 3 o 4 meses posteriores a la infección, la concentración plasmática viral se reduce hasta un nivel estable denominado *set point* (punto de referencia) y la enfermedad queda en estado clínico latente. El *set point* se ha utilizado como un predictor del progreso de la infección en cada individuo, ya que la infección progresa más rápidamente en personas con viremia más alta (19) (20). En esta etapa disminuye del número de células CD4, en una tasa

aproximada de 60 células/ml/año. Durante esta etapa el paciente puede estar asintomático por años, la diseminación del virus sigue siendo contenida por parte de los linfocitos CD8, ya que la replicación continua a una tasa baja en los ganglios linfáticos, al final de esta etapa la concentración de estas células finalmente disminuye. Las partículas virales sufren múltiples modificaciones puntuales como resultado de presiones inmunológicas (19) (27). La fase asintomática tiene un promedio de duración de 7-10 años (20).

Fase sintomática y SIDA. En la última fase se desarrolla el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida que se caracteriza por una cuenta de linfocitos CD4 por debajo de 200 ml y aumento de la carga viral de manera exponencial (20) (27). Con el compromiso de las células T en la enfermedad, múltiples microorganismos pueden invadir al hospedero y por lo tanto los individuos presentan infecciones oportunistas o infecciones comunes con presentaciones clínicas (19). Además del descenso evidente de los linfocitos T CD4+ e inversión del cociente linfocitario CD4/CD8, se produce activación policlonal de los linfocitos B con aumento de los niveles séricos de inmnoglobulinas, descenso de interleucina-2, disminución de la actividad de los linfocitos NK, disminución de la reacción cutánea a antígenos de memoria y disminución de la respuesta proliferativa de los linfocitos frente a la estimulación con mitógenos (27).

La clasificación de VIH/Sida del CDC (*Center for Disease Control*) está basada en el conteo de células CD4 y un diagnóstico previo relacionado con las condiciones de VIH. (Cuadro 1) (9).

Cuadro 1 CDC Clasificación sistémica para adultos y adolescentes infectados con VIH

Categorías de cuenta de células	Categorías Clínicas		
	A Asintomático, HIV, agudo o Linfadenopatia persistente generalizada	**B Condiciones sintomáticas, no A no C**	**C Indicadores de condiciones de Sida**
(1)≥500 células/µL	A1	B1	C1
(2)200-499 células/µL	A2	B2	C2
(3)<200 células/µL	A3	B3	C3

Cuadro 1. HRSA. Guide for HIV/AIDS. U.S. Department of Health and Human Services Clinical Care. 2014. (5)

3.7 DIAGNÓSTICO DE VIH

La detección y el diagnóstico individual de la infección por VIH y caso de Sida de acuerdo a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-010-SSA2-2010 PARA LA PREVENCION Y CONTROL DE LA INFECCION POR VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA se lleva a cabo a través de los siguientes procedimientos:

- **Pruebas de tamizaje:** presencia de anticuerpos contra VIH en suero, plasma, sangre total o líquido crevicular-saliva demostrada por los siguientes métodos: Ensayos inmunoenzimáticos convencionales, pruebas rápidas, inmunocromatográficas o ensayos de quimioluminiscencia (34).
- **Pruebas confirmatorias:** presencia de anticuerpos, antígeno o RNA del VIH en el suero o plasma demostrada por alguna de las siguientes pruebas (34).
    - Inmunoelectrotransferencia (Prueba de Western Blot),

- Inmunofluorescencia,
- Pruebas específicas que determinan la presencia del virus o algún componente del mismo:
    - Cultivo del virus
    - Determinación del antígeno viral
    - Determinación de ácidos nucleícos.

El diagnóstico clínico de infección por VIH de acuerdo a esta misma norma está definido por estos criterios:

- La persona que presente dos resultados de pruebas de tamizaje, de anticuerpos positivos y prueba confirmatoria positiva, incluyendo personas asintomáticas sin prácticas de riesgo se consideran sero-positivas a VIH (34).
- Se considera como posiblemente infectado, si se presentan dos resultados de pruebas de tamizaje reactiva pero prueba confirmatoria indeterminada (34).
- En el caso de niños menores de 18 años se deberá corroborar el diagnóstico por métodos moleculares o de cultivo viral (34).

3.8 TRATAMIENTO

En México desde 1997 se utiliza el tratamiento antirretroviral altamente activo TARAA (8). El Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA (CENSIDA) indica que **"**TARAA es la combinación de medicamentos de alta potencia antiviral utilizados en el tratamiento por la infección por el VIH, cuya eficacia ha sido probada en ensayos clínicos controlados" (8). El régimen antirretroviral para pacientes tratados por primera vez consisten en:

- Dos inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos, combinados con un tercer medicamento que pertenezca a una de las siguientes clases (32):
    - Inhibidor de la proteasa, con un potenciador farmacocinético como ritonavir o cobicistat (35).
    - Inhibidores de la integrasa (35).
    - Inhibidor de la transcriptasa reversa no análogo de los nucleósidos (35).

El objetivo del TARAA es conseguir una supresión prolongada y máxima de la carga viral en plasma, con niveles inferiores a 50 copias de RNA viral/ml (12).

3. 9 PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA DETECCIÓN DE INFECCIÓN RECIENTE

Los cambios serológicos y virológicos posteriores a la infección por VIH están determinados por varios biomarcadores, la elección del marcador depende del objetivo del estudio, el curso de la infección ocurre de la siguiente forma: el virus se replica en un sitio próximo a la inoculación, dando lugar a títulos altos de viremia (10^4 a 10^7 copias de RNA/ml de plasma) durante la 2-3ª semana posterior a la inoculación, por lo que el primer marcador es el RNA-VIH a los 10-12 días (14) (36) (37). El DNA proviral, que es el ADN de VIH integrado en el genoma celular, puede ser detectado prácticamente al mismo tiempo que el RNA-VIH, por ello el RNA detectable en ausencia de anticuerpos contra VIH es el marcador más temprano y sensible para detectar infección reciente (37). Pocos días después del acmé de la viremia, aumenta la concentración plasmática de proteína central gp24, siendo posible detectarla por 1-2 semanas (11-13 días), posteriormente ambos marcadores se vuelven indetectables, como consecuencia de la formación de inmunocomplejos (14) (37). Entre 1-2 semanas de la aparición de estos marcadores, se inicia la respuesta de tipo IgM con una intensidad y duración variable, perdurando por 1-2 semanas aproximadamente. Después aparece la respuesta de tipo IgG de manera gradual en un periodo de meses y que es la base para detectar infección reciente

en las pruebas serológicas(14) (38). Los anticuerpos presentan una máxima concentración a las 10-12 semanas, con una media de 22 días (39).

Los ensayos serológicos para infección reciente resultan atractivos por ser de bajo costo, su simplicidad en el manejo, facilidad en la técnica y su aplicación en ensayos que utilizan una toma única de muestra para diagnóstico (40).

Han surgido diversos grupos que han realizado el esfuerzo para desarrollar ensayos que detecten a la población con infección reciente, ya que existe la necesidad de validar el desarrollo de estos y a su vez que se desarrollen nuevos y mejores ensayos, para detectar la incidencia de VIH. La Organización Mundial de la Salud ha establecido un grupo de trabajo técnico de expertos, para los ensayos de incidencia de VIH, cuyos objetivos son: compartir los avances científicos sobre los ensayos de incidencia de VIH, crear una fuente central de conocimiento y de muestras, elaborar guías y documentos encaminados al uso de estos ensayos, así como evaluar y fomentar el desarrollo de mejoras en este tipo de pruebas. Las estrategias utilizadas para lograr estos objetivos son: revisión de la literatura, publicación de artículos sobre la evaluación de las pruebas de infección reciente, la creación de una base de datos con estos resultados, establecimiento de las especificaciones de las pruebas, definición de los requerimientos para el uso de los ensayos, desarrollo de protocolos y algoritmos para obtener resultados más confiables. (41)

El Consortium for the Evaluation and Performance of HIV Incidence Assays (CEPHIA) es un grupo que trabaja en conjunto con la Organización Mundial de la Salud y los CDC que se encarga de juntar a los líderes en el desarrollo de estos ensayos, evaluar su desempeño y la aplicación de algoritmos Recent Infection Testing Algorithm (RITAs) para la identificación de infección reciente de VIH. Su objetivo principal es tener avances sobre los ensayos actuales que son capaces de distinguir infección reciente de infección no reciente, para definir mejor el promedio de duración estado de infección reciente y determinar la propensión de que un

ensayo puede volver a clasificar como recientes a infecciones de larga duración (42).

Entre las pruebas serológicas más utilizadas a nivel internacional para detección de infección reciente, encontramos la de diferencia de proporciones (BED-CEIA) y la prueba de avidez (LAg-Avidity) (10) (4).

La prueba de diferencia de proporciones (BED-CEIA) es una prueba de segunda generación en ensayos de seroconversión de VIH (14). Este ensayo mide la proporción de IgG dirigido específicamente contra VIH, basado en el principio de que la proporción es menor en la infección reciente que en la infección de larga duración (10). La prueba contiene antígenos derivados de la región inmunodominante de la proteína gp41, con secuencias de los subtipos más representativos de VIH-1: B, CRF_01 AE y D, por lo que recibe el nombre de BED (14) (43). Estos tres péptidos se seleccionaron para cubrir una amplia diversidad antigénica y, en teoría, permitir utilizar un periodo de ventana único entre los subtipos, aunque se ha visto que existen diferencias en estos periodos entre los subtipos (14). Las muestras deben ser medidas por espectrofotometría, las que tengan resultado <1.2 tendrán que ser probadas nuevamente por triplicado, las que obtengan un resultado ≤0.8 serán consideradas de reciente seroconversión (44). Esta técnica debe ser utilizada en conjunto con modelos matemáticas para estimar la incidencia (45)

En algunos estudios las pruebas de diferencia de proporciones reportan una sobre estimación de la incidencia por mala clasificación de las infecciones recientes, por lo que se desarrolló una nueva prueba basada en avidez (46). Esta prueba mide la estabilidad de la unión de un péptido de multi-subtipos derivado de la región inmunodominante de la proteína gp41 con el anticuerpo específico de VIH en la presencia o ausencia de un agente caotrópico como la guanidina, que rompe los puentes de hidrogeno que determinan la estructura secundaria del anticuerpo y tienen un gran efecto en los anticuerpos tempranos (14) (47). Se basa en la premisa

de que los anticuerpos con baja avidez sugieren infección reciente (10). El punto de corte de esta prueba con resultado ≤ 2.0, tendrá que ser repetida por triplicado para su confirmación y si el resultado es ≤ 1.5 será diagnosticado como positiva para infección reciente (48).

Las limitantes que presentan ambos ensayos son que los casos de personas con infección de larga duración debido a un bajo título de anticuerpos contra VIH, predominio de algún subtipo de VIH en el escenario estudiado, pacientes donde la replicación del virus se controla espontáneamente manteniendo los niveles de la carga viral por debajo de los límites de detección denominados controles elite, uso de antirretrovirales e inmunosupresión severa, pueden ser clasificados erróneamente como infección reciente (10) (14) (49). Debido a que los ensayos de avidez no son dependientes de títulos de anticuerpos, deben estar menos influenciados por uso de tratamiento antirretroviral y por lo tanto teóricamente tener una tasa menor de falsos positivos (10). Se mencionan las características principales de ambas pruebas en el Cuadro 2 (48).

Cuadro 2. Comparación ¨Pruebas *Sedia™ BED HIV-1 Incidence EIA* and *Sedia™ HIV-1 LAg-Avidity EIA*		
Características del diseño de la prueba	BED VIH-CEIA	LAg-avidity
Fundamento	Mide la proporción de IgG dirigido específicamente contra VIH. Infección reciente= baja proporción Infección no reciente=alta proporción	Mide la avidez de los anticuerpos como indicador de la maduración de anticuerpos. Infección reciente= baja avidez Infección no reciente= alta avidez
Tipo de ensayo	ELISA	
Antígeno de VIH-1	Antígenos derivados de la región inmunodominante de la proteína gp41, con secuencias de los subtipos BED	La unión de un péptido de multi-subtipos derivado de la región inmunodominante de la proteína gp41.
Promedio del periodo de seroconversión (Infección reciente)	197 días (IC 95% 173-220 días)	130 días ((IC 95% 173-220 días) 118-142 días
Tasa de falsos positivos	(3-5%) Depende de factores de corrección y de la exclusión de sujetos con factores confusores (Sida, con terapia antirretroviral y elite controles)	(<1%) No depende de factores de corrección y se ve menos afectado por sujetos con factores confusores (personas con Sida, terapia antirretroviral y elite controles)
Aceptado por Consenso	Comercializado por primera vez en el 2004. Ampliamente utilizado en >35 países, en investigación por 10 años y utilizado en los programas de vigilancia nacionales de	Comercializado por primera vez en el 2011, cuenta con amplia aceptación y popularidad, utilizado en >33 países
Control de calidad	Ambos aprobados por los (Centers for Disease Control and Prevention) CDC	

La incidencia de VIH puede proveer la información valiosa para estudiar la dinámica actual de esta infección en una población, por lo que se han desarrollado pruebas

para la detección de infección reciente de VIH que permiten estimarla (4). Las pruebas para detección de infección reciente son pruebas cuantitativas de anticuerpos, motivo por el cual pueden verse afectadas por la calidad de la muestra y tener un impacto en el diagnóstico de la infección por VIH. El desempeño de las muestras puede verse afectado por el subtipo de VIH, diferencias en las poblaciones, un conteo bajo de CD4, Sida y terapia antiretroviral. Además existen diferencias individuales en el desarrollo de anticuerpos, lo que sugiere que este tipo de muestras solo deben ser utilizados estimación de la incidencia poblacional y no para identificar individuos con infección reciente (4).

PRUEBAS SEROLÓGICAS EN MUESTRAS DE SANGRE TOTAL RECONSTITUIDAS

Las muestras de sangre seca en papel filtro (DBS; dried blood spots, por sus siglas en inglés) se han utilizado ampliamente para detectar enfermedades congénitas, desordenes metabólicos, detectar RNA/DNA, estudios inmunológicos, evaluar el estado nutricional y en estudios forenses (50). En enfermedades como VIH/Sida se usan muestras de sangre seca adsorbidas en el papel filtro, para detectar antígenos o anticuerpos específicos contra VIH-1, genotipificar, amplificar el ácido nucleico viral y para realizar pruebas para resistencia a fármacos antivirales (51).

Los avances que se han tenido en estas pruebas permiten detectar infección reciente a través del uso de plasma, suero, o sangre secos en papel filtro (dried plasma spot, DPS), suero seco en papel filtro (dried serum spot, DSS), lo cual permite y facilita el procesamiento de las muestras, su almacenamiento y transportación (52). Las variantes de DSS y DPS fueron desarrolladas para optimizar el desempeño en la extracción de DNA y RNA (53). Los tipos de papel filtro mayormente utilizados a nivel internacional son el Whatman BFC 180 fabricado por Whatman International Ltd, Inglaterra, en Europa Occidental es el de Schleider & Schuell 2992, en USA y Australia el Schleicher & Schuell 903^{TM} (54).

La cantidad recolectada de muestra para DBS va desde 50 a 100 µl de sangre o plasma, o 1-2 gotas colocadas en el círculo de papel filtro (53). Los DBS pueden ser almacenados a temperatura ambiente (25-35°C), en refrigeración a una temperatura de 4°C o en congelación desde -20°C hasta -70°C (53). Se recomienda dejar secar las muestras de sangre total de 3 hasta 24 horas alejadas de la luz, este tiempo de secado no afecta la calidad de la muestra en su desempeño (50) (55). Las muestras en papel filtro pueden permanecer estables hasta un promedio de 14 días a temperatura ambiente (15-30°C), ya que después de este número de días la calidad de los materiales depositados en el papel filtro puede degradarse (4) (56). Aunque el método más utilizado para obtención de muestras para DBS es el de la punción en el dedo, los DBS también pueden ser obtenidos de sangre recolectada a partir de un tubo con anticoagulante (4).

Los pasos para colocar la muestra en el papel filtro son:

1. Colocar directamente la muestra de sangre de la punta del dedo o con una pipeta en el papel filtro, que viene con círculos preimpresos que contienen hasta 100 µl de sangre cuando están completos. En caso de que el papel filtro no posea estos círculos preimpresos, se debe colocar la sangre en el papel de modo que se forme un circulo de 1.5 cm diámetro. Se debe permitir que la sangre empape a través y llene el círculo completo (4).
2. Se debe etiquetar un área del papel filtro con el código de referencia de la muestra, después de que los círculos hayan sido rellenados con la muestra de sangre (4).
3. Suspenda las tiras de papel filtro durante el proceso de secado para permitir que el aire circule alrededor del papel. También pueden ser colocadas entre dos libros, pegando las tiras a los libros con cinta adhesiva, para que la parte del papel filtro donde se colocó la muestra de sangre no entre en contacto con la superficie de la mesa del laboratorio (4).
4. Permitir que los DBS se sequen a temperatura a ambiente por un mínimo de 3 horas, en climas cálidos deben dejarse por un mínimo de 24 horas. No se

deben apilar las hojas de papel filtro, ni permitir que se toquen otras superficies mientras se están secando (4).

5. Después de que las manchas de sangre se hayan secado adecuadamente, envuelva la tira en una hoja de paper glassine o plástico para prevenir el arrastre de una hoja de papel filtro a otra (4).
6. Coloque las tiras envueltas en una bolsa impermeable al gas (bolsa zip-lock) con desecante y un indicador de humedad. Se pueden colocar aproximadamente 20 tiras en cada bolsa (4).

Este tipo de muestras posee las siguientes ventajas y desventajas:

- Son fáciles de recolectar en cualquier entorno (4).
- No se requiere de una centrifuga u otro equipo para procesamiento de las muestras de sangre (4).
- Fácilmente transportadas a un laboratorio para realización de futuras pruebas (4).
- Facilitan la detección de prevalencia e incidencia (4).
- La cantidad de muestra requerida del paciente es menor (53).
- No se requiere de una cadena de frio para almacenamiento de la muestra de manera inmediata, posterior a la toma de la muestra (53).
- Disminuye el riesgo biológico de contaminación para el personal de salud cuando la muestra se seca (57).

Sin embargo, entre sus desventajas se encuentran:

- Requieren de un tipo específico de papel filtro(4) (10).
- Modificaciones en el procesamiento requerido para la elusión de DBS y pruebas de VIH (10).
- Potencialmente pueden tener menor precisión si la prueba no es optimizada para DBS (falsos positivos y/o falsos negativos) (10).

- El procesamiento de la muestra puede hacerse más largo si el paso de elusión es requerido (10).
- Poca cantidad de muestra de sangre recolectada para el estudio y que derive en dificultad en el laboratorio para extracción de esta sin contaminarla (10).

4 JUSTIFICACIÓN

En la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012 se estimó una seroprevalencia cruda de VIH en personas de 15 a 49 años de 0.15% (3), lo que representaría 180,000 casos en todo el país, con una razón hombre:mujer de 3.4 (2) En 2011 investigadores del INSP realizaron una encuesta de seroprevalencia de VIH entre hombres que tienen sexo con hombres (HSH) que asisten a sitios de encuentro social/sexual y estimaron que la seroprevalencia cruda de VIH fue de 16.9%. Estas cifras indican que aunque se ha logrado contener la epidemia por debajo de los valores latinoamericanos y mundiales, es necesario fortalecer esfuerzos para su control, particularmente en poblaciones clave (58).

Estimar la incidencia de VIH contribuye a evaluar el impacto de medidas de prevención primaria, orientar intervenciones en poblaciones clave, llevar a cabo intervenciones para reducir la transmisión y monitorear la epidemia. La desventaja de la medición de la incidencia es tener que realizarlo a través de estudios de cohorte que resultan costosos, es necesario seguir a una muestra grande, en un periodo de tiempo prolongado y se necesita gran cantidad de recursos humanos y financieros para lograrlo. Una opción para obtener la incidencia es a través de la prevalencia, pero esta medida no refleja directamente la tasa de transmisión actual de la infección (10) (11). Debido a estas desventajas en los estudios de incidencia, se han desarrollado biomarcadores en ensayos para pruebas serológicas, que potencialmente permiten identificar si una infección puede ser considerada como reciente (4) (10) (13).

Con base en la variación de resultados que se han encontrado en diversas poblaciones alrededor del mundo en estas pruebas serológicas, se desea conocer el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de dos pruebas serológicas para infecciones recientes de VIH en una población mexicana de hombres que tienen sexo con hombres. Se espera identificar qué prueba o pruebas

serológicas son mejores para la detección de la infección reciente de este virus, que podrá ser una herramienta para conocer el impacto de los programas de salud actuales.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de dos pruebas serológicas para estimar infecciones recientes de VIH-1 en una población mexicana de HSH.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la correlación de dos pruebas serológicas en muestras de suero fresco y de sangre seca en papel filtro.
- Calcular la sensibilidad y especificidad y los valores predictivos positivo y negativo, de las dos pruebas serológicas (BED-CEIA y LAg-Avidity).
- Proponer puntos de corte para las pruebas serológicas (BED-CEIA y LAg-Avidity) en una población mexicana.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal descriptivo para evaluar el desempeño de dos pruebas de detección de infección reciente por VIH-1 en hombres que tienen sexo con hombres que viven con VIH, atendidos en la Clínica Especializada Condesa (CEC) de la Ciudad de México durante el periodo del 2012 al 2015.

Criterios de inclusión:

- Muestras de suero con un volumen igual a 100 µl (80 para el análisis incluyendo las repeticiones y 20 para congelación).
- Muestras de suero que contaron en el expediente clínico con la información de carga viral, conteo de linfocitos CD4 y tiempo de seroconversión a VIH-1.

Criterios de exclusión:

- Muestras de suero cuyo volumen fuera menor a 100 µl.
- Pacientes que no pertenezcan a la población clave en la Clínica Especializada Condesa.
- Muestras de pacientes que hubieran recibido tratamiento antirretroviral y su carga viral fuera indetectable.

6.1 VALIDACIÓN DE LA RECONSTITUCIÓN DE DBS A PARTIR DE MUESTRAS DE SUERO

6.1.1. Objetivo metodológico: Validación de la reconstitución de una DBS utilizando suero de características serológicas conocidas.

Este proceso se desarrolló ya que las muestras otorgadas por la Clínica Especializada Condesa (CEC), para detección de infección reciente de VIH-1, eran de suero y para tener una muestra equiparable, se obtuvo una muestra de sangre completa a partir de estas, mezclando cada una de las muestras de suero CEC, con eritrocitos de un sujeto control negativo para VIH, VHS-2 y *Treponema pallidum,* de manera que garantizamos que los únicos anticuerpos presentes fueran los del suero CEC, el objetivo de los eritrocitos fue únicamente para trabajar con la misma matriz en papel filtro. Para validar este proceso de reconstitución se llevó a cabo el ensayo inmunoenzimático (ELISA) para virus del herpes simplex tipo 2 (VHS-2) (FOCUS Diagnostics, Part Of Diasorin Group, Langenhagen-Hannover), una prueba de aglutinación de partículas para detección de *Treponema pallidum* (SERODIA®-TP-PA, FUJIREBIO, Göteborg) y se midió la concentración de proteínas séricas totales por espectrofotometría con el equipo Nanodrop 1006//Thermo Scientific™ (Thermo Fisher Scientific Inc, Walthman,MA), en especímenes de suero congelado de un banco de muestras con que cuenta el laboratorio de infecciones de transmisión sexual del CISEI, en las cuales ya se había realizado detección de anticuerpos de VIH, VHS-2 y *Treponema pallidum.* Estas muestras fueron extraídas de población HSH de la Clínica Especializada Condesa, y fueron almacenadas durante un promedio de 36 meses. Previo a la evaluación de la correlación entre suero y BDS, se validó la forma de papel filtro y la cantidad utilizada con 10,15 y 20 µl en BDS spot y DBS tarjeta de papel filtro completa.

Para los estudios de ELISA para detección de virus de herpes tipo 2 se trabajaron con 13 muestras, para la medición de concentración de proteínas se trabajaron con 25 muestras y en la detección de anticuerpos contra *Treponema pallidum* se trabajó

con un total de 34 muestras. Se realizaron los análisis ya mencionados para la detección de anticuerpos, con todas las muestras de reconstitución de sangre seca a partir de suero, previo a la detección de anticuerpos.

Una vez validado este proceso, se realizó la evaluación entre muestras de suero y DBS con las dos pruebas serológicas para infección reciente de VIH-1 (BED-CEIA y LAg-Avidity). La cantidad de la muestra de suero con que se trabajó a partir de las muestras sangre, fue aproximadamente de 100, se corroboró la eficiencia del proceso de reconstitución de sangre seca a partir de suero.

Diseño para la obtención de DBS a partir de un control conocido. Es la mezcla de eritrocitos de una sujeto negativo con un suero de serología conocida para estandarizar la reconstitución de una DBS. Se tomó una de muestra de sangre de 7 ml mediante venipunción periférica a un sujeto control de 42 años de edad, con detección previa de anticuerpos negativos para VIH, VSH2 y *Treponema pallidum*. La sangre se colectó en tubos secos con anticoagulante EDTA (Vacutainer ®, Fabricante, Ciudad) y se homogeneizó inmediatamente en mezcladora por 3 min para evitar la formación de coágulos. Posteriormente se centrifugo la muestra para retirar el plasma y los eritrocitos obtenidos fueron lavados tres veces con solución salina amortiguada por fosfato, Phospate-buffered saline (PBS). Para el lavado se retiró el plasma obtenido del tubo con una micropipeta y se añadió esa misma cantidad de PBS con pH de 7.4, se mantuvo en movimiento por 30 seg en mezcladora, posteriormente se centrifugó a 2,500 rpm por cinco minutos. Con una micropipeta se extrajo la cantidad de PBS añadida y se completó el proceso hasta realizar los 3 ciclos de lavado. A continuación se mezclaron 25 µl de eritrocitos del sujeto control con 25 µl de muestra de suero, en un vial para ser puestas en refrigeración.

Posteriormente se tomó una tarjeta completa de papel filtro S&S 903 (Schleicher & Schuell 903^{TM}, Whatman International Ltd, Ontario) y se dispensaron 72 muestras reconstituidas de controles conocidos de 20, 15 y 10 µl respectivamente, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 horas y posteriormente se recortaron las

manchas de sangre seca (DBS tarjeta). Por otro lado en papel filtro previamente cortado en punch de 6 mm, se impregnaron 20, 15 y 10 µl de la muestra reconstituida de controles conocidos, se dejaron secar los spots y se congelaron a -4º C durante 15 días. De esta manera se obtuvieron DBS a partir de tarjeta completa y otros tres a parir de un punch, cada uno con tres cantidades de muestra, (20,15 y 10).

Detección de VHS-2 en suero y DBS. Se detectaron anticuerpos contra VHS-2 mediante ELISA (FOCUS Diagnostics, Part Of Diasorin Group, Langenhagen-Hannover), ELISA IgG cuyo propósito es hacer detectar cualitativamente de anticuerpos humanos de tipo IgG contra VHS-2 en suero humano. En este kit los micropozos de poliestireno están recubiertos con antígeno recombinante gG-2, las muestras de suero diluido y los controles fueron incubados en los pozos para permitir que los anticuerpos específicos presentes en las muestras reaccionen con el antígeno. Los anticuerpos no específicos se remueven en los lavados, la peroxidasa conjugada contra IgG humana se añadió para reaccionar con la IgG específica, el exceso de conjugado fue retirado en el lavado, posteriormente se añadió la enzima sustrato y el cromógeno para que se desarrollará color. Después se añadió el reactivo de paro para terminar la reacción y se produjera un cambio de color, el cual fue cuantificado por espectrofotometría realizando una lectura de densidad óptica y las lecturas de densidad óptica de las muestras fueron comparadas con los puntos de corte referidos de las densidades ópticas en el kit para determinar resultados (59). Las muestras se realizaron según instrucciones del fabricante, en las muestras de suero se realizó una dilución 1:101, las muestras de DBS reconstituido se realizaron con una elusión durante 14 hrs, con 400 µl de solución PBS buffer con pH de 7.4, posteriormente se tomaron 100 µl y se siguieron las instrucciones del fabricante para el desarrollo de la placa de ELISA. Los pasos completos de la prueba se encuentran en el anexo 2.

Detección de *T. pallidum* en suero y DBS. Se utilizó la prueba de aglutinación pasiva de partículas de gelatina para la detección de anticuerpos contra *Treponema*

pallidum (SERODIA TP-PA). El kit de esta prueba utiliza partículas de gelatina sensibilizadas con antígenos de *T. pallidum* purificado de la cepa Nichols y se basa en la aglutinación de estas partículas en presencia de anticuerpos contra *T. pallidum* en plasma o suero humano (60). Las muestras de suero fueron diluidas, con ajuste de 1:40 a 1:10, posteriormente se agregaron 25 µl de partículas no sensibilizadas y 25 µl de partículas sensibilizadas en el pozo correspondiente y se continuaron con las instrucciones establecidas por el fabricante. Los pasos completos de la prueba se encuentran en el anexo 4.

Determinación de la concentración de proteínas. Se realizó la medición de proteínas séricas totales en muestras de DBS y suero por espectrofotometría con el equipo Nanodrop 1006/Thermo Scientific™ (Thermo Fisher Scientific Inc, Walthman,MA). La absorbancia de las proteínas se determina en la región del ultravioleta a 280 nm, ya que los grupos aromáticos (Phe, Trp y Tyr) existentes en las proteínas tienen un máximo de absorbancia en esta región (61) (62). Se utilizaron 1.5 µl de cada muestra y se utilizó el programa Protein A280 del Nanodrop, se calcularon las medias y desviaciones estándar para las muestras DBS tarjeta, DBS spots y suero, las primeras con sus respectivas concentraciones (10,15 y 20 µl). Los pasos completos de la prueba se encuentran en el anexo 3.

Detección de VIH en suero

Antes de realizar el ensayo de infección reciente por VIH, se corroboró que las muestras de estudio fueran positivas a anticuerpos contra VIH mediante la prueba rápida HEXAGON HIV (Human, Wiesbaden). Esta prueba fue diseñada para detectar rápida y cualitativamente anticuerpos IgG, IgA y IgM contra los virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1 y VIH-2 en la sangre total, el suero o plasma humano. El kit cuenta con un dispositivo donde los resultados se muestran como dos líneas separadas que identifican presencia de VIH-1 o VIH-2, aunque esta prueba no está destinada para diferenciar entre una infección por el VIH-1 o el VIH-2. La prueba HEXAGON HIV es un ensayo de 3ª generación basada en un método inmunocromatográfico. La prueba utiliza antígenos recombinantes que representan

las regiones inmunodominantes de las proteínas de envoltura de los virus VIH-1 y VIH-2. Los antígenos de captura gp41 y p24 del VIH-1 se fijan sobre la membrana en la línea de prueba 1, y el antígeno de captura gp36 del VIH-2 es inmovilizado en la línea de prueba 2. Los mismos antígenos están unidos a un colorante y localizados en almohadilla conjugada del dispositivo. Una región estrecha de la tira reactiva, sensibilizada con anticuerpos anti-VIH, sirve de línea de control C. Cuando la muestra migra a través de la almohadilla absorbente, los anticuerpos anti-VIH o anti-VIH3 específicos de los antígenos recombinantes se ligan al conjugado coloreado, formando inmunocomplejos. Estos complejos son inmovilizados por los antígenos de captura respectivos fijados en las líneas de prueba 1 y 2 respectivamente, produciendo allí líneas roja violetas. El excedente de conjugado se fija en la línea de control C para demostrar el funcionamiento correcto de los reactivos (63). Se detectaron anticuerpos en cinco muestras de suero obtenidas del banco de muestras de laboratorio de ITS del CISEI, reactivas a VIH, que fueron almacenadas en ultracongelación (-70º C) durante 36 meses. Esta comparación fue para evaluar la validez de criterio de la prueba HEXAGON VIH en diferentes concentraciones y con diluyente de la prueba BED-CEIA. Posteriormente se aplicó la prueba rápida HEXAGON HIV a todas las muestras de infección reciente. Las muestras con resultado no reactivo se les aplico la prueba rápida Determine y la prueba confirmatoria Serodia HIV. Los pasos completos de las pruebas se encuentran en los anexos 5, 6 y 7.

6.2 DESARROLLO DE LAS PRUEBAS DE INFECCIÓN RECIENTE

Las pruebas serológicas para infección reciente de VIH, con las que se trabajaron son la de diferencia de proporciones (BED-CEIA) y la prueba de avidez (Lag-Avidity).

Se trabajó con un total de 224 muestras, 140 muestras de suero de la Clínica Especializada Condesa clasificadas como infección reciente un vial tuvo que ser excluido por no contener muestra de suero. Las 85 muestras restantes, provenientes de la misma clínica, pero de un estudio de cohorte previo con al menos 12 meses de diagnóstico de VIH, muestras de infección no reciente.

Se llevó a cabo descongelación de los viales para realizar 4 alícuotas de 20 µl cada una, la primera fue destinada para la reconstitución de sangre total, la segunda para la realización de la prueba de BED-CEIA, la tercera para el desarrollo de la prueba de LAg-Avidity y el restante fue puesto en congelación.

Con la primer alícuota se realizó la reconstitución de sangre total con los eritrocitos (20 µl) y suero (20 µl) de cada una de las muestras de estudio. (Anexo 1). Posteriormente se dispensaron 10 µl en los 4 círculos de las tarjetas de papel filtro, se dejaron secar por 5 horas aproximadamente a 23°C, con un 50% de humedad relativa. Las tarjetas filtro fueron colocadas en bolsas de plástico individuales y se congelaron por mes y medio.

BED-CEIA. El fundamento de la prueba de diferencia de proporciones (BED-CEIA) es que contiene antígenos derivados de la región inmunodominante de la proteína gp41, con secuencias de los subtipos más representativos de VIH-1: B, E y D (43). Se encarga de medir la proporción de IgG dirigido específicamente para VIH, basándose en el principio de que la proporción es menor en la infección reciente que en la infección de larga duración (10). Las muestras se miden por espectrofotometría, las que tengan un resultado de ODn (densidad óptica normalizada) >1.2 son consideradas infección no reciente, las que presenten una ODn ≤1.2 tendrán que ser probadas nuevamente por triplicado y las que obtengan un resultado ≤0.8 serán consideradas de reciente seroconversión (44). Posterior a la congelación, se procesaron las muestras de DBS, fue recortado un spot de 6 mm (10 µl) para ser eluidas con el diluyente de muestra del kit de la prueba de BED-CEIA (400 µl). Posteriormente se procesaron las muestras de suero, según instrucciones del fabricante, que se encuentran en el anexo 8.

Se realizó la lectura por espectofotometria de las placas, se revisó que los controles y calibradores estuvieron dentro de los intervalos aceptables descritos en el kit de la prueba, posteriormente se obtuvo la normalización de cada muestra con el calibrador (44). La densidad óptica normalizada (ODn) se calculó al dividir el valor de la densidad óptica entre la mediana de la densidad óptica del calibrador, posteriormente se verifico que los controles y calibradores estuvieron dentro de los parámetros establecidos por la prueba. Como parte de la validación interensayo e intraensayo se corrieron muestras por triplicado, obteniéndose la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

LAg-Avidity. La prueba de avidez (LAg-Avidity) mide la estabilidad de la unión de un péptido de multi-subtipos derivado de la región inmunodominante de la proteína gp41 con el anticuerpo especifico de VIH en la presencia o ausencia de un agente caotrópico como la guanidina, y los anticuerpos que presenten una baja avidez se considerarán sugestivos de infección reciente (9) (45) (46). Se debe revisar que los controles y calibradores estén dentro de un intervalo aceptable y obtenerse la normalización de cada muestra con el calibrador. Las muestras son medidas por espectrofotometría, las que obtienen un resultado de ODn >2.0 se consideran infección no reciente, las de ODn ≤2.0 deben ser repetidas por triplicado para confirmación y si el resultado es ≤1.5 serán diagnosticadas como positivas para infección reciente (48). Posterior a la congelación, se procesaron las muestras de DBS, fue recortado un spot de 6 mm (10 µl) para ser eluidas con el diluyente de muestra del kit de la prueba de LAg-Avidity (500 µl). Posteriormente se procesaron las muestras de suero, según instrucciones del fabricante, que se encuentran en el anexo 9. Como parte de la validación interensayo e intraensayo se corrieron muestras por triplicado, obteniéndose la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se estimó la correlación lineal entre los títulos de anticuerpos contra VIH-1 en suero y DBS en las pruebas de BED-CEIA y LAg-avidity mediante el coeficiente de correlación r de Pearson. Se realizaron las gráficas de cada una de estas y el resultado se clasifico de la siguiente manera: la concordancia suele considerarse muy buena si R es mayor de 0,90, buena si está entre 0,71 y 0,90, moderada entre 0,51 y 0,70, mediocre entre 0,31 y 0,50, y mala o nula si R es inferior a 0,31 (64).

Posteriormente se determinó la concordancia entre suero y DBS en ambas pruebas, para determinar los resultados entre infección reciente contra infección no reciente. Los resultados obtenidos fueron clasificados con el índice Kappa, como se indica (64):

Coeficiente kappa	Fuerza de la concordancia
< 0,20	Inferiores
0,21-0,40	Débil
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Buena
>0,80	Muy buena

Cuadro 3. Clasificación del coeficiente kappa.

A continuación se obtuvieron las categorías diagnósticas: verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos, falsos negativos, a partir de los resultados de pruebas BED-CEIA y LAg-Avidity, considerando como estándar de oro, la información de la Clínica Especializada Condesa, aquellos con un resultado confirmado a VIH y con un resultado previo negativo (menos de un año). (Cuadro 2)

Posteriormente se obtuvo, la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo con intervalos de confianza del 95%.

Cuadro 4. Categorías diagnósticas		
	Estándar de oro positivo	**Estándar de oro negativo**
Prueba positivo	Verdaderos positivos (VP)	Falsos positivos (FP)
Prueba negativa	Falsos negativos (FN)	Verdaderos negativos (VN)

Cuadro 4. Cerda Jaime, Cifuentes Lorena. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. Rev. chil. infectol. 2012 Abr. 2015 Mayo 11;29(2): 138-141 (65).

La sensibilidad es la proporción de individuos clasificados como positivos por el estándar de oro que se identificaron correctamente por las pruebas de infección reciente (65).

Sensibilidad= VP/ (VP+FN)

La especificidad es la proporción de los individuos clasificados como negativos por el estándar de oro que se identificaron correctamente por las pruebas de infección reciente (65).

Especificidad= VN/ (FP+VN)

El valor predictivo positivo de un resultado positivo representa la probabilidad que alguien con un resultado positivo en la prueba de infección reciente tenga VIH, determinado por el patrón de oro (65).

Valor predictivo positivo=VP/VP+FP

El valor predictivo negativo de un resultado negativo representa la probabilidad de que alguien con un resultado negativo en la prueba de infección reciente no tenga VIH, determinado por el patrón de oro (65).

Valor predictivo negativo=VN/FN+VN

Se obtuvieron los intervalos de confianza para la sensibilidad y especificidad al 95% con las fórmulas (66):

$$IC95\%\ (Se) = Se \pm 1{,}96\ \sqrt{Se-(1-Se)/m}$$

$$IC95\%\ (Es) = Es \pm 1{,}96\ \sqrt{Es-(1-Es)/n}$$

m= número de personas con infección reciente
n= número de personas con infección de larga duración

Se realizaron curvas ROC (Curvas dependientes del Operador) para determinar el punto de corte de una escala continua en el que se alcance la sensibilidad y especificidad más alta. Son un método estadístico que determina la exactitud diagnóstico de una prueba, al comparar la capacidad discriminativa de 2 o más pruebas diagnósticas que expresan sus resultados con escalas continuas (65) (66). El punto de corte más alto en la gráfica es aquel que presenta el mayor índice de Youden, que se obtiene: (65) (67) Sensibilidad + Especificidad -1). Gráficamente el punto de la curva más cercano al ángulo superior izquierdo (punto 0.1), es aquel cuya sensibilidad y especificidad son igual a 100% (65) (67), aunque en el presente estudio fue el ángulo inferior derecho. Los puntos de cortes se deben encontrar los más lejano a la diagonal de referencia en el gráfica, ya que esta línea describe lo que sería una curva ROC de infección reciente incapaz de discriminar pacientes con infección reciente vs infección no reciente, esto se debe a que cada uno de los puntos de corte que la compara determina la misma proporción de Verdaderos Positivos y Falsos positivos (65) (67). El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS v15.

7 RESULTADOS

7.1 VALIDACIÓN DE LA RECONSTITUCIÓN DE DRIED BLOOD SPOTS A PARTIR DE MUESTRAS DE SUERO

Detección de VHS-2 en suero y DBS

Los resultados de la prueba fue FOCUS Diagnostics HerpeSelect 2 ELISA IgG se compararon con los resultados de 13 muestras, observándose que existe una concordancia del 100% entre las muestras de DBS tarjeta y DBS spots en las tres cantidades utilizadas (10,15 y 20 µl), con las muestras de suero que son positivas y negativas de la pruebas de ELISA para anticuerpos HVS-2.

La prueba de ELISA genera un resultado cuantitativo (ODn), el cual fue comparado entre DBS y suero, presentándose en todos los casos una buena correlación, mayor entre 0.888 y 0.975, como se presenta en la figura 2.

Figura 2. Correlación de sangre seca en papel filtro y suero para VHS-2

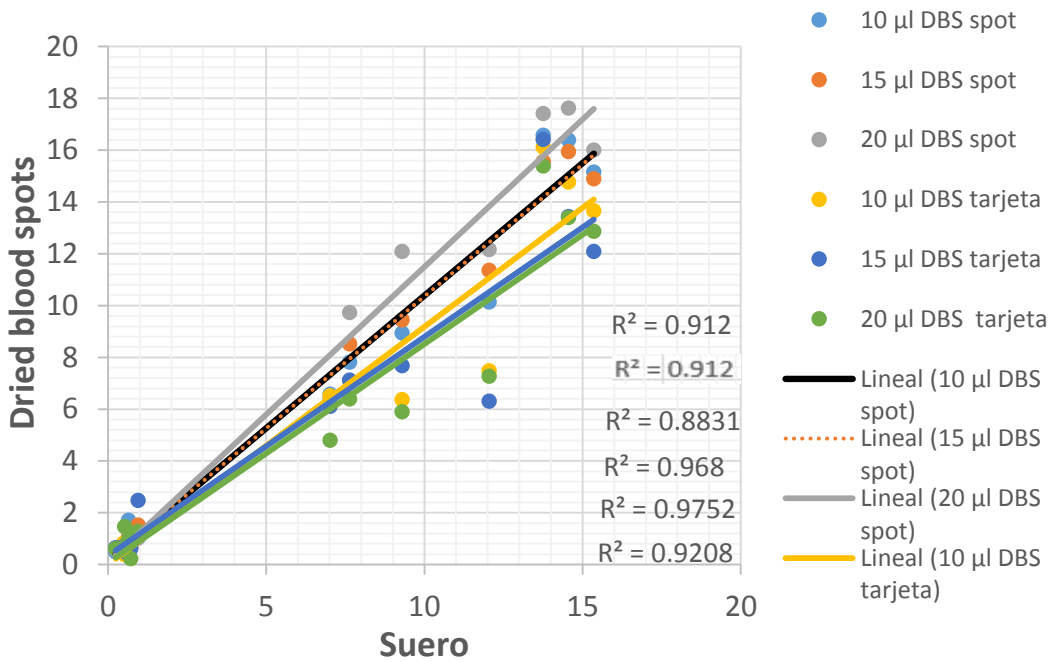


Figura 2. Correlación de DBS tarjeta, DBS spots y suero para VHS-2

Detección de *T. pallidum* en suero y DBS

Se obtuvo una concordancia del 100% en los resultados de 34 muestras de 10 µl con DBS tarjeta con una dilución 1:10 para las muestras de Serodia TP-PA. Al realizar diluciones 1:40 y 1:20, no se logró la concordancia del 100%.

RESULTADOS SERODIA TP-PA 10 µl PC							
MUESTRA		R suero previo	1er exp resultado	Repetición 1er exp resultado	2o exp pozo 1	2o exp pozo 3	Estadio
Dilución			1:40	1:40	1:10	1:20	
1	ECO 565-3	-	+	-	-	-	(-)
2	ECO 567-4	+	±	+	++	±	VDRL -
3	ECO 580-3	+	-	-	+	±	1:1<1:8
4	ECO 585-3	+	-	-	++	+	VDRL -
5	ECO 387-4	+	-	-	+	-	1:1<1:8
6	ECO 411-3	+	-	-	+	-	VDRL -
7	ECO 432-3	+	-	+	+	±	1:1<1:8
8	ECO 220-4	+	-	+	+	±	>1:8
9	ECO 544-4	-	-	-	-	-	(-)

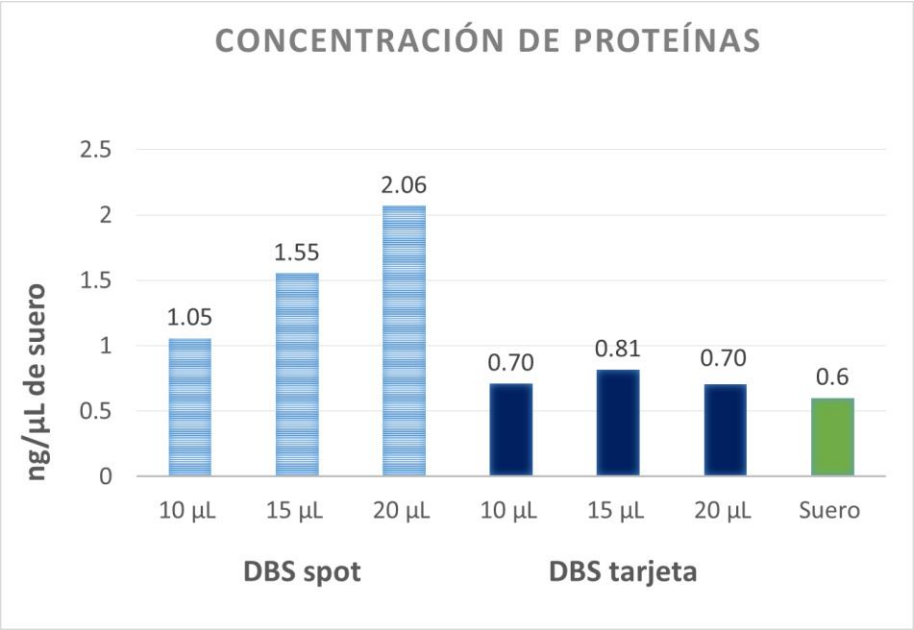
Cuadro 5. Resultados de muestras para detección contra anticuerpos de *Treponema pallidum* con diferentes diluciones.

Determinación de la concentración de proteínas.

En la determinación de la concentración de proteínas, el promedio de suero diluido 1:100 fue de 0.59 ng/µl, se observó que tanto en los DBS spots como DBS tarjeta las concentraciones promedio fueron superiores a las de suero. Los grupos con mayores desviaciones estándar fueron el grupo DBS spots con cantidad de 20 µl, de ±0.65 ng/µl y el grupo DBS tarjeta con 15 µl, de ±0.59 ng/µl.

Se observó una adecuada concentración de proteínas desde las muestras de 10 µl tanto en DBS spots y como DBS tarjeta, tal como se presenta en la figura 3.

Figura 3. Cuantificación de proteínas con diferentes concentraciones de muestra. DBS tarjeta y DBS spots



Dado que el manejo de DBS tarjeta conlleva menores riesgos de contaminación para el personal de salud y debido a que el riesgo de infectividad se pierde en el momento que la muestra se seca, preferimos trabajar con las muestras de DBS tarjeta, en papel filtro completo, a partir de una cantidad de 10 µl de muestra de sangre reconstituida (68).

Detección de VIH-1 en muestras con infección reciente.

En la detección de anticuerpos en las 5 muestras del banco de muestras de laboratorio de ITS del CISEI, con diagnóstico previo de VIH, para validar la prueba HEXAGON VIH y con diluyente de la prueba BED-CEIA, se encontró una correlación del 100%.

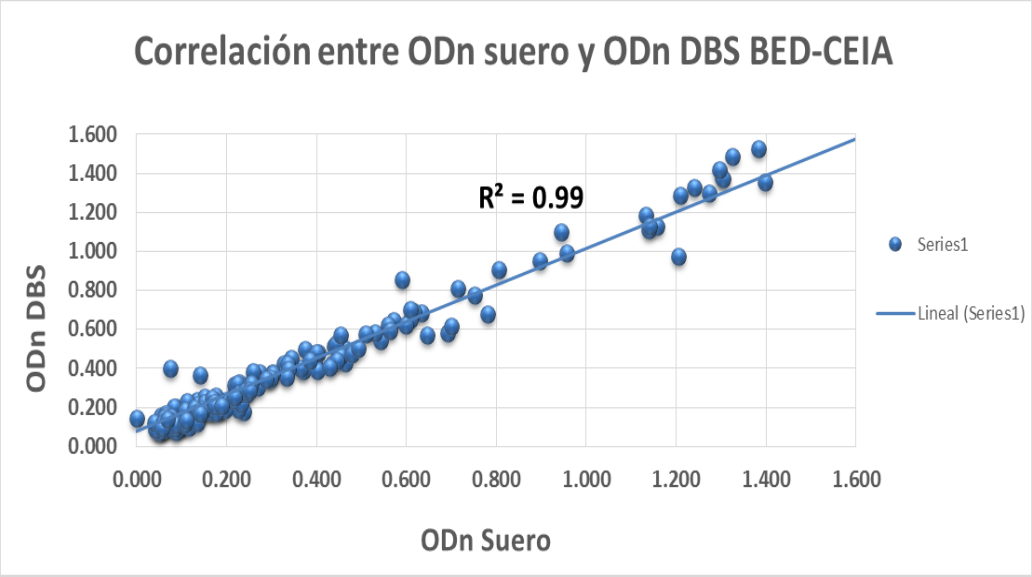
Posteriormente se aplicó la prueba rápida HEXAGON HIV a todas las muestras de infección reciente, de las 139 muestras, 135 muestras presentaron un resultado positivo para anticuerpos, lo que representa el 97.1% de las muestras.

Las 4 muestras con resultado no reactivo se les aplico la prueba rápida Determine, encontrándose negativas. Al aplicar la prueba confirmatoria Serodia HIV a estas mismas 4 muestras, se obtuvo un resultado negativo para dos muestras y positivo para las otras dos.

7.2 COMPARACIÓN DBS-SUERO BED-CEIA

Se obtuvo una correlación del 99% en los resultados de las 224 muestras de DBS con los resultados de suero en la prueba BED-CEIA, al considerar el valor normalizado de las absorbancias (ODn) tal como se presenta en la figura 4.

Figura 4. Correlación de DBS y suero con BED-CEIA



En la prueba BED-CEIA, de las 224 muestras 223 fueron concordantes en los resultados entre suero y DBS, se encontraron 62 en el rango de densidad óptica normalizada >0.8 que indica negatividad para infección reciente, 161 dentro del rango de ODn ≤0.8 de infección reciente y 1 que se encontró positivo para infección reciente por suero y negativo por DBS, se obtuvo una concordancia del 99.55%.Cuadro 46.

Cuadro 6. Concordancia entre suero y DBS BED-CEIA.

BED-CEIA		Suero		
		Positivo IR	Negativo IR	
		≤ 0.8 ODn	>0.8 ODn	Total
DBS	Positivo IR ≤ 0.8 ODn	161	0	161
	Negativo IR >0.8 ODn	1	62	63
Total		162	62	224

Variación intraensayo. En la variación intraensayo de las placas de ELISA para las muestras DBS los coeficientes de variación para los controles fueron menores del 5% y se encontraron en un intervalo de 0.29% a 4.6%. Eliminamos los controles negativos ya que solo se cuentan con dos valores en comparación con los calibradores, controles positivos altos y bajos que cuentan con tres valores, como se presenta en el cuadro 5.

Cuadro 7. Variación intraensayo de controles y calibrador en ensayos independientes.

Variación intraensayo de controles y calibrador	
	% Coeficiente de variación
Calibrador	0.986 -1.004
Control positivo bajo	0.558-0.578
Control positivo alto	1.587-1.641

La variación intraensayo de las muestras fue menor del 10%, con excepción de una muestra que obtuvo un coeficiente de variación del 45.4%, por lo que se hizo una corrección al eliminar el valor más alejado de las 3 lecturas de densidad óptica normalizada quedando el CV 5.23%, como se ve en el cuadro 8.

Cuadro 8. Coeficiente de variación intraensayo y ejemplo de corrección aplicada en una muestra.

Coeficiente variación Muestras	1.17-11.09
Valores ODn IR-027	1.301 0.606 0.653
Media	0.853
Desviación estándar	0.3881
Coeficiente variación	45.487
Factor de corrección	
Media	0.63
Desviación estándar	0.033
Coeficiente variación	5.2378

Variación interensayo. La variación interensayo de los controles y calibradores fue menor del 10%, el coeficiente de variación del calibrador fue 0.95%, para el control positivo bajo fue de 1.75% y de 2.2% para el control positivo alto, se consideraron los promedio de tres ensayos, como se presenta en el cuadro 9.

Cuadro 9. Variación interensayo de controles y calibrador en ensayos independientes.

Variación interensayo de controles y calibrador	% Coeficiente de variación
Calibrador	0.959
Control positivo bajo	1.757
Control positivo alto	2.200

La variación interensayo de las muestras que se hicieron por triplicado fue menor del 15%, de las 8 muestras que se corrieron por triplicado en tres ensayos diferentes, una obtuvo un coeficiente de variación del 17.64%.

La sensibilidad obtenida de los DBS con respecto al suero fue de 99%, la especificidad fue del 100%. Se observó que los dried blood spots detectan la mayor cantidad de casos de infección reciente, ya que el valor predictivo fue del 100%, como se observa en el cuadro 10.

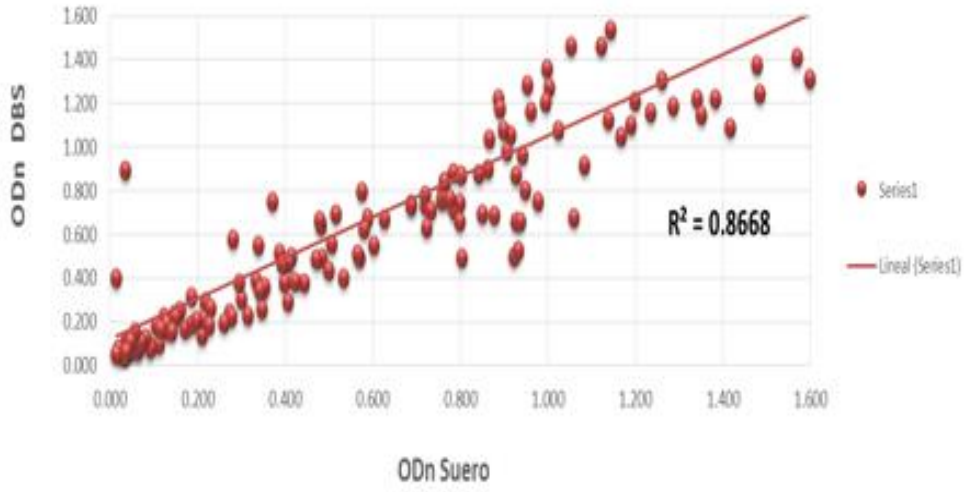
Cuadro 10. Valores de DBS con respecto a suero de BED-CEIA

Concordancia	223/224=99.55%
Sensibilidad	161/162=99%
Especificidad	62/62=100%
VPP	161/161=100%
VPN	62/63=98%

7.3 COMPARACIÓN DBS - SUERO LAg-avidity

Se obtuvo una correlación del 86.7% en los resultados de las 224 muestras de DBS con los resultados de suero en la prueba LAg-avidity, como se presenta en la figura 5.

Figura 5. Correlación de DBS y suero con LAg-avidity.



En la prueba LAg-avidity de las 224 muestras 216 fueron concordantes en los resultados entre suero y DBS, se encontraron 145 dentro del intervalo de ODn ≤1.5 siendo positivas para infección reciente, 71 en el intervalo entre >1.5 de ODn que indica negatividad para ésta.

Se identificaron 8 muestras que fueron discordantes, 2 fueron positivas para infección reciente por suero y negativas por DBS, 6 muestras fueron negativas para infección reciente por suero y positivas por DBS.

Se obtuvo una concordancia del 96.4% de las 216 muestras que fueron clasificadas correctamente entre el suero y los DBS, como se presenta en el cuadro 11.

Cuadro 11. Concordancia entre suero y DBS, LAg-avidity.

LAg-avidity		Suero		
		Positivo IR	Negativo IR	Total
		≤ 1.5	> 1.5	
DBS	Positivo IR ≤ 1.5	145	6	151
	Negativo IR > 1.5	2	71	73
Total		147	77	224

En LAg-avidity la variación intraensayo de las muestras DBS, los coeficientes de variación fueron menores del 12% y se encontraron en un intervalo de 0.97% a 11.8%. Eliminamos los controles negativos ya que solo se cuentan con dos valores en comparación con el resto de los controles y calibradores, como se presenta en el cuadro 12

Cuadro 12. Variación intraensayo de controles y calibrador en ensayos independientes.

Variación intraensayo de controles y calibrador

	% Coeficiente de variación
Calibrador	1.658-6.017
Control positivo bajo	2.935-9.308
Control positivo alto	0.970-11.802

La variación intraensayo de las muestras que se realizaron por triplicado fue menor del 29.46%, hubo una muestra que obtuvo un coeficiente de variación del 45.64%, por lo que se hizo una corrección de control de calidad al eliminar el valor más alejado de las 3 lecturas de densidad óptica normalizada quedando en 1,85%.

Variación interensayo. La variación interensayo de los controles y calibradores fue menor del 11%, el coeficiente de variación del calibrador fue 1.36%, para el control

positivo bajo fue de 10.39% y de 10.83% para el control positivo alto, como se presenta en el cuadro 13.

Cuadro 13. Variación interensayo de controles y calibrador en ensayos independientes.

Variación interensayo de controles y calibrador	
Calibrador	1.367
Control positivo bajo	10.392
Control positivo alto	10.830

En la prueba LAg-avidity se obtuvo una sensibilidad de los DBS con respecto al suero de 98.6%, la especificidad fue del 92%. El valor predictivo positivo fue de 96.0%, lo que indica que los dried blood spots detectan mayor cantidad de casos de infección reciente de los que realmente se encuentran categorizados como positivos en esta prueba, como se observa en el cuadro 14.

Cuadro 14. Valores de DBS con respecto a suero de BED-CEIA

Concordancia	216/224= 96.42%
Sensibilidad	145/147=98.60%
Especificidad	71/77=92%
VPP	145/151=96.02%
VPN	71/73=97%

7.4 Comparación BED-CEIA y LAg-avidity vs infección reciente

El estándar de oro para la infección reciente, fue la información de la Clínica Especializada Condesa, en la que los casos de infección reciente se comprobaron al ser precedidos de una muestra seronegativa a VIH. Los casos de infección no reciente, tuvieron al menos 24 meses de diagnosticados a VIH.

Suero vs infección reciente, BED-CEIA. De las 224 muestras, 197 fueron concordantes, el 87.9%, ($p<0.001$). (Cuadro 15)

Cuadro 15 Concordancia entre infección reciente por expediente y suero, BED-CEIA

BED-CEIA		Expediente		Total
		Positivo IR ≤ 0.8	Negativo IR >0.8	
Suero	Positivo IR ≤ 0.8	137	25	162
	Negativo IR >0.8	2	60	62
Total		139	85	224

La sensibilidad encontrada fue del 98.56%, la especificidad del 70.58%, se observó que BED-CEIA detectó mayor cantidad de casos de infección reciente, por lo que el valor predictivo fue 84.6%. (Cuadro 17). Se observó un 11.2% de falsos positivos y un 9% de falsos negativos. El 61.2 % fue clasificado como verdadero positivo con esta prueba y el 26.8% restante como verdadero negativo, los datos son 15.4%, 3.2%, 84.6% y 96.8, de acuerdo al cuadro 16.

Cuadro 16. Valores de suero con respecto a estándar de oro, BED-CEIA

Concordancia	197/224=87.94%
Sensibilidad	137139=98.56%
Especificidad	60/85=70.58%
VPP	137/162=84.56%
VPN	60/62= 96.77%

Suero vs infección reciente, LAg-avidity

De los resultados de las muestras, 208 muestras de 224 fueron concordantes, lo que indica que el 92.85% fueron clasificadas de manera correcta. Se observaron 16 muestras discordantes, 4 resultaron positivas para infección reciente en el estándar de oro pero negativas por la detección de Lag-avidity, las 12 muestras restantes dieron negativas a infección reciente por expediente pero positivas por Lag-avidity. (Cuadro 17)

Cuadro 17 Concordancia entre infección reciente por expediente y suero, LAg-avidity

Lag-avidity		Expediente		
		Positivo IR	Negativo IR	Total
		≤ 1.5	> 1.5	
Suero	Positivo IR ≤ 1.5	135	12	147
	Negativo IR > 1.5	4	73	77
Total		139	85	224

En las muestras clasificadas como infección reciente por expediente el 91.8% fue correctamente clasificada por LAg-avidity y el 8.2% como no reciente por este mismo. En la categoría de infección no reciente por expediente y LAg-avidity, se encontró el 94.8% (verdaderos negativos), el 5.2% restante se encontró como

infección no reciente por expediente pero reciente por LAg-avidity (falsos negativos).

Para la prueba LAg-avidity en suero se obtuvo una sensibilidad contra el expediente en el diagnóstico de infección reciente del 97.12%, una especificidad del 85.88%. El valor predictivo positivo fue mayor que el del 91.83% y el valor predictivo negativo del 94.80%, como se muestra en el cuadro 18.

Cuadro 18. Valores de suero con respecto a estándar de oro, LAg-avidity

Concordancia	208/224=92.9
Sensibilidad	135/139=97.1%
Especificidad	73/85= 85.9%
VPP	135/147=91.8%
VPN	73/77=94.8%

DBS vs infección reciente, BED-CEIA

En el caso de infección reciente con BED-CEIA por DBS contra infección reciente por expediente, se encontró la cantidad de 197 muestras concordantes de las 224, obteniendo una concordancia del 87.8%. (Cuadro 19). En el caso de los DBS, se encontró una muestra de más clasificada en la casilla de falsos negativos, en comparación con las muestras de suero, considerando BED-CEIA.

Cuadro 19 Concordancia entre infección reciente por expediente y DBS, BED-CEIA

BED-CEIA		Expediente		Total
		Positivo IR	Negativo IR	
		≤ 0.8	>0.8	
DBS	Positivo IR ≤ 0.8	136	24	160
	Negativo IR >0.8	3	61	64
Total		139	85	224

Se clasificaron como infección reciente por DBS y expediente el 85% de las muestras (verdaderos positivos), el 15% restante se encontró como no reciente por expediente (falsos positivos). Como infección no reciente por DBS y por expediente se encontró el 95.3% (verdaderos negativos) y el 4.7% fue clasificado como reciente por expediente (falsos negativos).

Se identificó una sensibilidad para los casos de infección reciente por expediente con respecto a los DBS de 97.8% y una especificidad de 71.8%. El valor predictivo positivo fue del 85%, como se muestra en el cuadro 20.

Cuadro 20. Valores de DBS con respecto a estándar de oro, BED-CEIA

Concordancia	197/224=87.9%
Sensibilidad	136/139=97.8%
Especificidad	61/85=71.8%
VPP	136/160=85.0%
VPN	61/64=95.31%

DBS vs infección reciente, LAg-avidity

De las 224 muestras 208 fueron concordantes en los resultados entre infección reciente por expediente e infección reciente LAg-avidity en DBS. Se obtuvo una concordancia del 98.6. Se identificaron 16 muestras que fueron discordantes, 2 fueron positivas para infección reciente por LAg-avidity con DBS y negativas por expediente, 14 muestras fueron negativas para infección reciente por expediente y positivas por LAg-avidity en DBS. Cuadro 21.

Cuadro 21 Concordancia entre infección reciente por expediente y DBS, LAg-avidity

Lag-avidity		Expediente		Total
		Positivo IR	Negativo IR	
		≤ 1.5	> 1.5	
DBS	Positivo IR	137	14	151
	≤ 1.5			
	Negativo IR	2	71	73
	> 1.5			
Total		139	85	224

En la prueba LAg-avidity se encontró que el 90.7% fue clasificado correctamente entre el diagnóstico en expediente y por LAg-avidity con DBS, el 9.3% restante se clasificó como no reciente por expediente pero si como infección reciente por LAg-avidity (falsos positivos). En las infecciones no recientes por expedientes el 97.3% de las muestras fue clasificada como no reciente por LAg-avidity con DBS (verdaderos negativos) y el 2.7% como reciente por este método.

Se encontró una sensibilidad del 98.6% LAg-avidity al emplear DBS, la especificidad fue del 83.5%, el valor predictivo positivo del 90.7% y el negativo de 97.26%. Cuadro 20.

Cuadro 22. Valores de DBS con respecto a estándar de oro, BED-CEIA

Concordancia	208/224= 92.85%
Sensibilidad	137/139=98.56%
Especificidad	71/85=83.52%
VPP	137/151=90.72%
VPN	71/73=97.26%

7.5 Variables que modifican la detección de infección reciente.

Carga viral. En la detección de carga viral por suero con BED-CEIA, de los verdaderos positivos se encontró con carga viral de >1000 copias al 89.5% y de los verdaderos negativos el 43.3% presentaron >1000 copias. Al utilizar los DBS, se encontraron porcentajes similares del 89.4% y 42.6% respectivamente. Al utilizar Lag-avidity con suero, de los verdaderos positivos el mayor porcentaje se encontró con >1000 copias con un 89.3% y de los verdaderos negativos el 41.1% presento >1000 copias, siendo los porcentajes similares al usar LAg-avidity con DBS.
En los verdaderos positivos un 90.2% con una carga viral de >1000 copias y en y los verdaderos negativos el 42.3% con >1000 copias.

Linfocitos CD4. La prueba de BED-CEIA con suero, en el caso de los verdaderos positivos el 15.7% presentó <200 CD4/mm^3, para los verdaderos negativo el 10% tuvo <200 CD4/mm^3. En este prueba para DBS, el 15.8% de los verdaderos positivo tuvo <200 CD4/mm^3 y el 9.8% de los verdaderos negativos tuvo <200 CD4/mm^3. Al utilizar LAg-avidity en el caso de las muestras de suero, el 16.7% de los verdaderos positivos presentaron <200 CD4/mm^3, y el 9.6% de los verdaderos negativos tuvieron <200 CD4/mm^3. Al utilizar DBS con LAg-avidity, el 16.4% de los verdaderos

positivos presentaron <200 CD4 CD4/mm^3 y el 8.5% de los verdaderos negativos, se encontraron en este mismo intervalo.

7.6 Puntos de corte para BED-CEIA y LAg-Avidity, curvas ROC

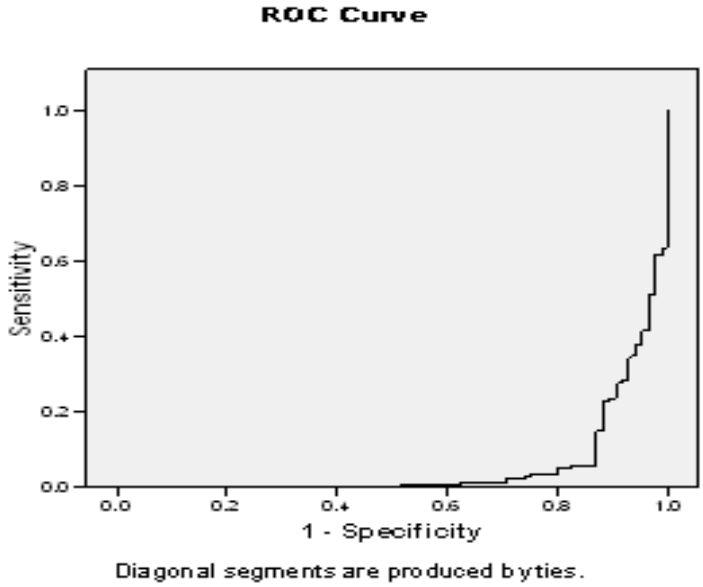
Prueba BED-CEIA suero.

El área bajo la curva BED-CEIA con suero fue de 0.0.943, (IC 95% 0.912-0.975)

El punto de corte más cercano para logar una sensibilidad del 90% es de 0.44, lo que conduce a una especificidad del 87%, para la prueba de BED-CEIA en suero. Para lograr una sensibilidad del 95% en la prueba se encontró un de corte de 0.55, obteniendo una especificidad del 82% para esta prueba. En el caso de requerir una especificidad del 95%, el punto de corte seria de 0.18 y con una sensibilidad del 62%, lo que excluiría a muchos casos de infección reciente.

Si la especificidad fuera del 90%, el punto de corte sería de .25 y una sensibilidad del 73%. Figura 6

Figura 6. Curva ROC muestra de suero, prueba BED-CEIA

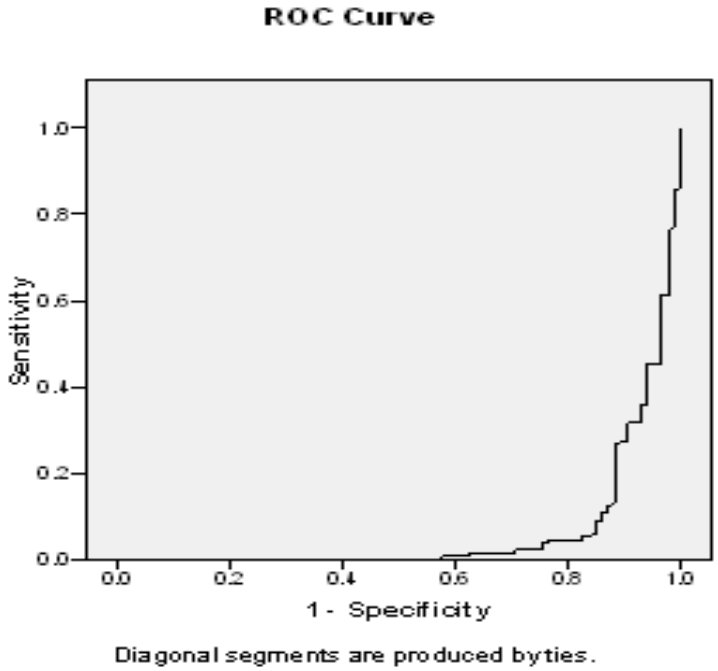


Prueba BED-CEIA DBS. Dejando una sensibilidad del 90%, el punto de corte es 0.47 y se alcanza una especificidad del 85%. El área bajo la curva para DBS fue 0.934 (IC 95% 0.898-971).

En esta prueba si desea tener una sensibilidad del 95%, el punto de corte a utilizar será de 0.57, con una especificidad del 83%.

Para una especificidad del 96% se necesita un punto de corte de 0.20 con una sensibilidad del 55%. Con una especificidad del 90% se requiere un punto de corte de 0.33 y la sensibilidad resulta del 73%. Figura 7.

Figura 7. Curva ROC muestra DBS, prueba BED-CEIA



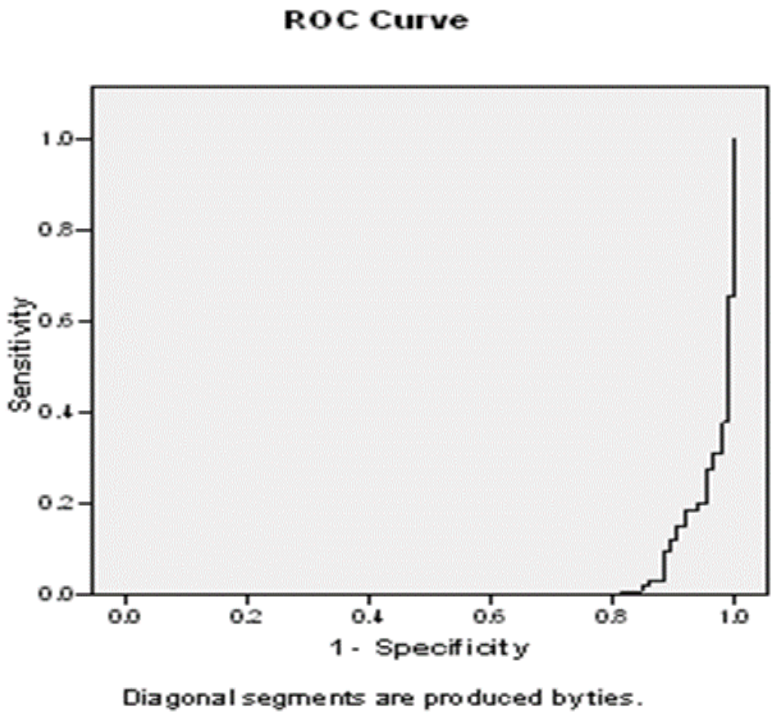
Prueba LAg-avidity suero. Si la prueba se deja en punto de corte de 1.1, la sensibilidad alcanzada es de 90% y la especificidad del 89%.

Curva ROC suero prueba LAg-avidity

En la prueba Lag-avidity en suero se obtuvo un área bajo la curva de 0.969 (IC 95% 0.947-0.991).

Si la sensibilidad de la prueba es del 95%, el punto de corte es de 1.34, con una especificidad del 88%. Para una especificidad del 95%, el punto de corte sería de 0.91 con una sensibilidad del 80%. Si la especificidad es del 90%, se necesita un punto de corte de 1.0 y se obtiene una sensibilidad del 88%. Figura 8.

Figura 8. Curva ROC muestra suero, prueba LAg-avidity



Prueba LAg-avidity DBS. El punto de corte propuesto para alcanzar una especificidad del 90%, es el de 1.04 y la sensibilidad de la prueba sería de 82%.

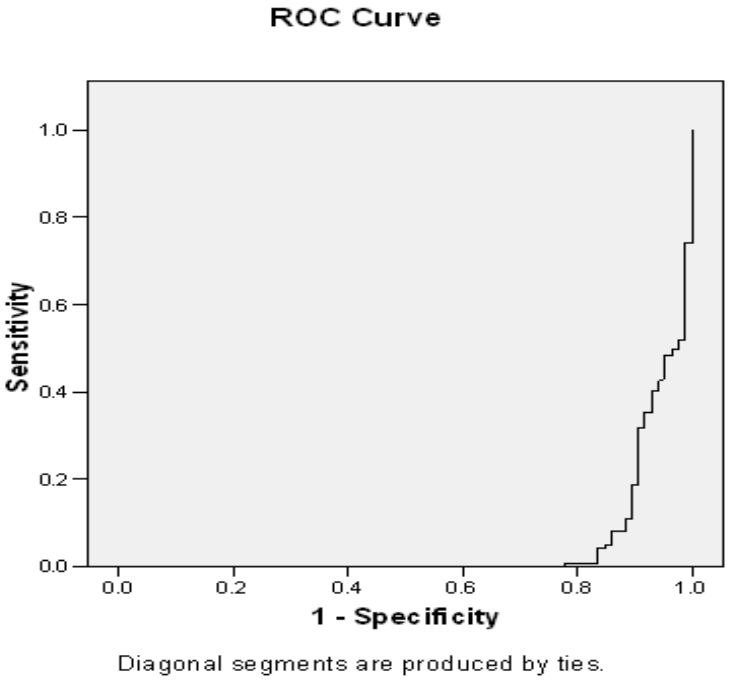
Curva ROC en DBS prueba Lag-avidity

Se obtuvo un área bajo la curva de 0.949 (IC 95% 0.918-0.981), lo que indica que la prueba discrimina de buena manera.

Si se propone un punto de corte de 1.32, la sensibilidad alcanzada es del 95% y la especificidad del 85%.

Para una especificidad del 95% se necesita un punto de corte de 0.64 con una sensibilidad del 57%. Si la especificidad es del 90%, el punto de corte sería de 1.0 con una sensibilidad del 82%. Figura 9.

Figura 9. Curva ROC muestra DBS, prueba LAg-avidity



La prueba que obtuvo un valor mayor de área bajo la curva, fue el de LAg-avidity en suero 0.969 lo que indica su mayor capacidad discriminativa para infección reciente y no reciente del resto de las pruebas. El que obtuvo el valor más bajo fue en la prueba de BED-CEIA en DBS, con 0.934.

DISCUSIÓN

Previo a la detección de infección reciente para VIH, se estandarizó un método de reconstitución de sangre para DBS a partir de suero. Como control de calidad para las muestras DBS, se evaluó la correlación entre muestras de suero y DBS al medir la concentración de proteínas por espectrofotometría, la cuantificación de anticuerpos con una ELISA para VHS-2 y la detección de infección por *Treponema pallidum* mediante la prueba de aglutinación de partículas (Serodia TP-PA).

En todas las muestras de DBS la correlación encontrada de proteínas fue suficiente, siendo superiores a las encontradas en la dilución de suero, si tomamos como referencia valida la toma de muestra, el secado a una temperatura ambiente y la conservación de las muestras para protegerlas de la humedad. En este trabajo se utilizó la técnica de gota completa para la colocación de las muestras en el papel filtro como ha sido utilizada en otros estudios, ya que este método elimina la variación en el esparcimiento de la sangre y en la homogeneidad de esta, además permite que las concentraciones de los analitos en los DBS sean más consistentes, incluso con diferentes niveles de hematocrito. (69)

Se identificó una adecuada concentración de proteínas desde las muestras en las que se colocó 10 µl en el papel filtro. Se prefirió trabajar con muestras de papel filtro completo, ya que existe mayor facilidad en su manejo, menor peligro de derrame de material biológico y la infectividad disminuye. Se trabajó con 10 µl en el papel filtro y se obtuvo una correlación del 100% en las pruebas de ELISA de anticuerpos contra VHS-2 entre las muestras de DBS y su respectiva muestra de suero. La prueba de Serodia TP-PA obtuvo la misma correlación, una vez que se ajustó la dilución a 1:10 en lugar de la recomendada por el fabricante para suero de 1:40. Deglón, et al. mencionan que el volumen requerido para usar en el papel filtro puede ser menor a 20 µl, utilizando como mínimo un volumen de 0.5 µl con una muestra de tipo venoso de cualquier tipo de analito (70). Bencomo, et al.

comprobaron que las variaciones del volumen celular de la sangre, no ocasionan variación de la absorbancia en las muestras utilizando el papel filtro S&S 903, al detectar anticuerpos VIH1/2 (71). En un estudio de Chaillet et al. reportaron la detección de anticuerpos contra VIH-1/2 en DBS, con las pruebas de ELISA Vironostika y Murex, se dejaron 14 y 30 días a temperatura ambiente, con concordancias de 99.4% y 99.2% respectivamente, el promedio de la temperatura ambiente fue de 23°C (intervalo de 18-25°C) (72).

Posterior a la validación completa y satisfactoria de los DBS, se continuó a la siguiente de fase de correlaciones de anticuerpos para VIH en DBS contra suero. La correlaciones obtenidas entre las muestras DBS-suero fueron del 99% en la prueba BED-CEIA y de 86.68% para la prueba de LAg-avidity; por lo que se confirma una muy buena correlación para la prueba BED-CEIA y buena para la prueba LAg-avidity.

Existe una concordancia del 99.6% de las muestras suero y DBS en la prueba BED-CEIA, para la prueba LAg-avidity la concordancia fue ligeramente menor, del 96.4%. Lo cual puede deberse a la variación intra e interensayo de las pruebas, se identificó una alta reproducibilidad para la prueba de BED-CEIA y ligeramente menor para LAg-avidity. En un estudio realizado con las pruebas BED-CEIA Y AxSYM avidity, se encontró que de 365 muestras, 28% y18.1% fueron identificadas como infección reciente, respectivamente; existió una regular concordancia entre ambas pruebas, con un kappa de 0.654 (43).

Al comparar la concordancia entre ambos métodos de clasificación de infección reciente encontramos que usando como marcador la lectura de ODn, el método BED-CEIA tiene un 100% de especificidad y de valor predictivo positivo, ya que ninguna de las muestras que de antemano sabíamos que corresponden a infección crónica fueron clasificadas como recientes usando BED-CEIA. Sin embargo el método LAg-avidity tiene una especificidad menor, empleando como marcador la lectura de ODn, probablemente debido a que los puntos de corte de ambas técnicas son diferentes y a la variabilidad de la técnica LAg-avidity.Otro estudio realizado con

las pruebas Vironostika y BED demostró una sensibilidad para las infecciones recientes de 93.3% para ambas, una especificidad para infecciones de larga duración de 75.0% para Vironostika y de 81.3% utilizando BED. Los valores predictivos positivos fueron 60.9% para BED y 53.8% en Vironostika. Los valores predictivos negativos fueron de 97.5% utilizando BED y de 97.3% con Vironostika (73).

Se encontró una concordancia similar en los resultados entre el estándar de oro, con suero y DBS en la prueba BED-CEIA, menor al 90%, en la prueba LAg-avidity en ambos casos la concordancia fue mayor al 90%, DBS con el 98.6%, suero 92.9%.

En las muestras clasificadas con el estándar de oro, considerando el VPP la prueba que mayor porcentaje obtuvo fue LAg-avidity con el 91.8%, en segundo lugar fue la misma prueba pero en DBS con 90.7%, le siguió BED-CEIA en DBS con el 85% y finalmente en suero con el 84.6%. En el caso del VPN en DBS con LAg-avidity en un 97.3%, seguido de suero con BED-CEIA con un 96.8%, 95.3% en DBS con BED-CEIA y finalmente con LAg-avidity en suero con un 94.8%. En la prueba BED-CEIA la sensibilidad obtenida con suero fue de 98.6%, con DBS 97.8%, para LAg-avidity con suero fue 97.1% y en DBS 98.6%, en todos los casos la sensibilidad fue muy alta. La especificidad de BED-CEIA con suero fue del 70.6%, con DBS 71.8%, para LAg-avidity la especificidad con suero fue de 85.9% y con DBS 83.5%, siendo mayor la especificidad de LAg-avidity.

Se ha observado que como el fundamento de la prueba BED-CEIA se basa en medir la proporción de IgG dirigido específicamente para VIH, individuos con supresión viral (con tratamiento antirretroviral y controladores elite) o cuando los anticuerpos declinan por la progresión del VIH, están en riesgo de ser clasificados erróneamente como infección reciente. En el caso de las pruebas de avidez depende del grado de maduración de los anticuerpos, que estará directamente relacionado con la duración de la infección, por lo que en sujetos con disminución

de los anticuerpos como en la supresión viral o con enfermedad avanzada, serán mejor clasificados por estas pruebas (14).

En ambas pruebas, los porcentajes de verdaderos positivos con carga viral <1000 copias fueron muy similares, alrededor del 90%, se ha reportado que al presentar cargas virales altas, se deben de excluir las muestras para detección de infección reciente. La prueba de BED-CEIA menciona que los pacientes con carga viral indetectable deben ser excluidos de la población en estudio si se desea aumentar el valor predictivo en esta, pero se si se realizará se estaría perdiendo al 22% del total de estos pacientes. El CEPHIA (Consortium for the Evaluation and Performance of HIV Incidence Assays) estableció el límite de carga viral (<75 copias/mL) como infección no reciente, se encontró para BED-CEIA el 56.5% de falsos positivos y en LAg-avidity el 47.1% (74).

La prueba BED-CEIA menciona en su inserto que una de sus limitantes, es cuando una persona presenta un conteo de linfocitos <200CD4/mm^3, debe ser excluida de la población en estudio para aumentar el valor predictivo de la prueba. El porcentaje de verdaderos positivos con <200CD4/mm^3 fueron del 9.8%, al 15.7%, por lo que de eliminarlos, se estarían perdiendo alrededor del 10% de los casos de infección reciente, independientemente de la prueba utilizada. En la evaluación del CEPHIA) reportó una tasa de falsos positivos con linfocitos >200CD4/mm^3 como un *proxy* de Sida, para LAg-avidity del 0%(0.00-2.4%) y para BED-CEIA del 4%(IC 95% 1.3-9.2) (74).

En relación a la infección reciente contra el conteo de linfocitos CD4 con un límite de 200, se identificó que la mayor cantidad de pacientes tuvieron un conteo mayor a este límite. De los pacientes con infección reciente el 83.8% presento >200 CD4/mm^3 y con infección no reciente el 90.6% (P>0.001). Cuando el límite de linfocitos CD4 se estableció en 350, en los casos de infección reciente fue el 57.4% y para infección no reciente 64.7.

En el caso de LAg-avidity su inserto menciona que esta prueba no debe ser utilizada en individuos con terapia antiretroviral en cualquier estadio de infección de VIH, independientemente del conteo de CD4 que tengan (75).

Ambas pruebas mencionan que los pacientes que están recibiendo terapia antiretroviral deben ser excluidos y que los medicamentos interfieren en la maduración o persistencia de los anticuerpos contra VIH (75), por diseño del estudio se identificó que en los casos de infección reciente por expediente el 100% no recibió tratamiento y en los de infección no reciente el 65.9% si recibía.

La prueba que obtuvo un valor mayor de área bajo la curva fue LAg-avidity en suero y la menor BED-CEIA en DBS, sin embargo en todos los casos el poder de discriminación es mayor al 93%, siendo satisfactorias todas las pruebas.

En las curvas ROC de ambas pruebas se evaluaron nuevos puntos de corte, se alcanzara una especificidad, ya que la sensibilidad se encuentra mayor al 98%, para lograrlo sin afectar la sensibilidad, se propone la creación de zonas grises, con lo que se aumentaría la especificidad al realizar una segunda prueba. Para BED-CEIA en el punto de corte propuesto para obtener una especificidad del 90% sería 0.3 (zona gris 0.3-0.8) tanto para suero como DBS. En el caso de LAg-avidity el punto de corte para una especificidad del 90% sería 1.0 (zona gris de 1.0-1.5). Hauser et al. Observaron que utilizando el punto de corte de 1.0 para LAg-avidity como fue inicialmente propuesto por el fabricante en el 2012, la tasa de verdaderos positivos era del 31% comparado con el 86% de la prueba Bio Rad (p=0.0001) y el 62% de BED-CEIA (p=0.03). Al reajustar el punto de corte de LAg-avidity a 1.5 ODn como fue propuesto por su fabricante un año después, mejoro la tasa de verdaderos positivos a 48%, este aumento en el punto de corte se vio acompañado con una disminución en el promedio del periodo de seroconversión de 141 a 130 días (76).

Hye-Kyung, et al utilizaron en su estudio para determinar infección reciente el punto de corte para BED-CEIA ≤ 0.8, Longosz y col. siguieron los puntos de corte LAg-avidity.≤ 1.5 para diagnóstico de seroconversión de infección reciente (77) (78).

Las limitaciones de este estudio son que el tamaño de la muestra se considera pequeño debido a que se utilizaron 139 muestras con infección reciente y 85 con infección no reciente; existen 4 muestras a las cuales no se les realizó detección de linfocitos CD4, ni carga viral. Nuestra muestra no es representativa del país, ya que la prevalencia en población clave es diferente a la prevalencia en el grupo de mujeres embarazadas u otros grupos de la población mexicana. Los resultados obtenidos no pueden ser extrapolados a otras poblaciones mundiales ni a otras poblaciones en riesgo en México de contraer de VIH, esto debido a que los puntos de corte obtenidos son exclusivos para la población mexicana de HSH. Aunque se conocía que personas habían iniciado tratamiento, se desconoce la adherencia al mismo, así como los que no han iniciado tratamiento, si habían presentado terapia profiláctica de manera previa.

9 CONCLUSIONES

Se recomienda realizar la reconstitución de DBS para validar diversos analitos u otros biomarcadores, en una dilución 1:1, con 10 µl de suero y 10 µl de eritrocitos. Se debe preferir el uso de DBS en tarjeta de papel filtro completo por cuestiones de bioseguridad en el laboratorio.

Se encontró una muy buena correlación entre DBS con los resultados de suero, en las prueba BED-CEIA y LAg-avidity, por lo que los DBS pueden ser utilizados como una excelente alternativa en estudios de campo e investigación donde se dificulte utilizar muestras de suero.

La sensibilidad identificada en ambas pruebas para DBS y suero fueron superiores al 97%, los valores predictivos negativos se encontraron alrededor del 95%. En el caso de la especificidad fue menor para la prueba de BED-CEIA en suero, con un 70.6% y en DBS de 71.8%, en LAg-avidity se encontró alrededor del 84%; el valor predictivo positivo en BED-CEIA se identificó alrededor del 85% y el de LAg-avidity fue mayor, con un 91% aproximadamente. Los valores predictivos positivos y la especificidad en LAg-avidity son mayores, sin embargo en esta prueba se identificó un mayor coeficiente de variación intra e interensayo en las placas.

Estas pruebas deben ser utilizadas en conjunto, en algoritmos para la detección de infección reciente, con el fin de disminuir su tasa de falsos recientes positivos y al proponer zonas grises en los puntos de corte de ambas pruebas, la especificidad se puede mejorar. Para la prueba de BED-CEIA, la propuesta es crear una zona gris, que sea confirmada por la prueba LAg-avidity y para esta última la prueba confirmatoria debe ser una prueba molecular.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. ONUSIDA. INFORME MUNDIAL. Informe sobre la epidemia mundial de sida. OMS; 2016.

2. Magis C, Bravo E, Gayet C, Rivera P. El VIH y el sida en México al 2008: Hallazgos, tendencias y reflexiones. CENSIDA; 2008.

3. Izazola JA, Hernández-Ávila M. Seroprevalencia de VIH en población mexicana de entre 15 y 49 años: resultados de la Ensanut 2012. Salud Pública México [Internet]. 2014 [citado el 10 de marzo de 2016];56(4). Disponible en: http://www.medigraphic.com/pdfs/salpubmex/sal-2014/sal144c.pdf

4. TI S. Guidelines for Using HIV Testing Technologies in Surveillance. 2001 [citado el 10 de marzo de 2016]; Disponible en: http://www.who.int/entity/hiv/pub/surveillance/en/guidelinesforUsingHIVTestingTechs_E.pdf?ua=1

5. Balasubramanian R, Lagakos S. Estimating HIV evidence based on combined prevalence testing. Biom 2010. marzo de 2010;66(1):1–10.

6. Hallett TB, Stover J, Mishra V, Ghys PD, Gregson S, Boerma T. Estimates of HIV incidence from household-based prevalence surveys: AIDS. enero de 2010;24(1):147–52.

7. Mastro TD, Kim AA, Hallett T, Rehle T, Welte A, Laeyendecker O, et al. Estimating HIV incidence in populations using tests for recent infection: Issues, challenges and the way forward. J HIV AIDS Surveill Epidemiol. 2010;2(1):1.

8. Secretaria de Salud. Tratamiento antiretroviral del paciente adulto con infección por el VIH. 2008.

9. HRSA. Guide for HIV/AIDS. U.S. Department of Health and Human Services Clinical Care; 2014.

10. UNAIDS/WHO Working Group on Global HIV/AIDS and STI Surveillance, WHO Technical Working Group on HIV Incidence Assays, World Health Organization, Department of HIV/AIDS. When and how to use assays for recent infection to estimate HIV incidence at a population level [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2011 [citado el 10 de marzo de 2016]. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501675_eng.pdf

11. Hallett TB. Estimating the HIV incidence rate: recent and future developments: Curr Opin HIV AIDS. marzo de 2011;6(2):102–7.

12. CENSIDA. Guía de Manejo Antirretroviral de las Personas con VIH. SSA; 2012.

13. Lee LM, McKenna MT. Monitoring the incidence of HIV infection in the United States. Public Health Rep. 2007;122(suppl):172–9.

14. Murphy G, Parry JV. Assays for the detection of recent infections with human immunodeficiency virus type 1. Euro Surveill. 2008;13(36):314–320.

15. Lazcano E, Fernandez E, Salazar E, Hernández M. Estudios de cohorte. Metodología, sesgos y aplicación. Salud Pública Méx. 2000;42(3):230–41.

16. Brookmeyer R, et al. Cross-Sectional HIV Incidence Estimation in HIV Prevention Research. J Acquir Immune Defic Syndr. 2013;63:S233–9.

17. Brooks G, Butel J, Morse S. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelbe. Vol. p. 637-653. El Manual Moderno; 1996.

18. Levy J. El VIH y la patogénesis del SIDA. 1a ed. Vol. p.21-38. México: INER; 2008.

19. Collier I. Virología humana. 3a ed. Vol. p.179-183. Inglaterra: Mc. Graw Hill; 2008.

20. Manual CTO de Medicina y Cirugía. Infectología. 8va ed. Vols. p100-101. España;

21. Holmes K, et al. Sexually Transmitted Diseases. 4a ed. Vol. p.326-331. USA: Mc Graw Hill; 2008.

22. Chauca E. Historia Natural de la Infección por el VIH [Internet]. Colegio Odontológico del Perú; 2004. 10-14 p. Disponible en: http://www.bvsde.paho.org/texcom/cd050854/chaucahi.pdf

23. OMS. ONUSIDA. Hoja informativa regional. 2012.

24. Gutiérrez JP, Sucilla-Pérez H, Conde-González CJ, Izazola JA, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. Seroprevalencia de VIH en población mexicana de entre 15 y 49 años: resultados de la Ensanut 2012. Salud Pública Méx. 2014;56:323–332.

25. SS/CENSIDA. Dirección de Investigación Operativa, con base en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de VIHy sida. 2014.

26. La epidemia del VIH y el sida en México.2014. [Internet]. CENSIDA; Disponible en: http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/L_E_V_S.pdf

27. Flint S, Krug R, Racaniello V, Skalka A. Pinciples of Virology. Vol. p. 640-642. USA: ASM; 2000.

28. SS/CENSIDA. Programa en respuesta al VIH, el sida e ITS, 2013-2018 México: Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el sida. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. 2014.

29. SS/CENSIDA. Boletín No. 23 SALVAR: Datos al 31 de diciembre de 2013. México: Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el sida. 2013.

30. SS/CENSIDA. Informe Nacional de Avances en la Respuesta al VIH y el sida. 2014.

31. Pope M. Mucosal dendritic cells and immunodeficiency viruses. J Infect Dis. 1999;179:S427–30.

32. Soto LE. Electrónico(Vancouver) Soto Ramírez Luis Enrique. Mecanismos patogénicos de la infección por VIH. Rev invest clín. 2004;56(2):143–52.

33. Lee B, Montaner LJ. Chemokine immunobiology in HIV-1 pathogenesis. J Leukoc Biol. 1999;65(5):552–65.

34. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-010-SSA2-2010 PARA LA PREVENCION Y CONTROL DE LA INFECCION POR VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.

35. Department of Health and Human Services. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. [Internet]. Disponible en: http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/AdultandAdolescentGL.pdf

36. Butto S, Suligoi B, Fanales-Belasio E, Raimoindo M. Laboratory diagnostics for HIV infection. Ann Ist Super Sanitá. 2010;46:24–33.

37. Tebourski F, Slim A, Elgaaied A. The significance of combining World Health Organization and Center for Disease Control criteria to resolve indeterminate human immunodeficiency virus tipe-1 Western blot results. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;48:59–61.

38. Gaines H, Sönnerborg A, Forsgren M, Pehrson PO, Strannegård Ö, Von Sydow M. Antigen detection in primary HIV infection. Br Med J Clin Res Ed. 1988;296(6617):238–40.

39. Fanales-Belasio E, Raimoindo M, Suligoi B, Butto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. Ann Ist Super Sanitá. 2010;46:5–14.

40. Duong YT, Qiu M, De AK, Jackson K, Dobbs T, Kim AA, et al. Detection of Recent HIV-1 Infection Using a New Limiting-Antigen Avidity Assay: Potential for HIV-1 Incidence Estimates and Avidity Maturation Studies. Plos ONE. 2012;7(3).

41. World Health Organization. In vitro diagnostics and laboratory technology [Internet]. In vitro diagnostics and laboratory techonology. 2016 [citado el 16 de agosto de 2016]. Disponible en: http://www.who.int/diagnostics_laboratory/links/hiv_incidence_assay/en/index1.html

42. Consortiumf for the Evaluation and Performance of HIV Incidence Assays. CEPHIA Overwiew [Internet]. [citado el 16 de agosto de 2016]. Disponible en: http://www.incidence-estimation.com/page/cephia-overview

43. Salustiano DM, de Lima KO, Cavalcanti AMS, Diaz RS, Lacerda HR. Comparison among the BED capture enzyme immunoassay test and AxSYM avidity index assay for determining recent HIV infection and incidence in two Voluntary Counselling and Testing Centres in Northeast Brazil. Braz J Infect Dis. julio de 2014;18(4):449–53.

44. CALYPTE. BIOMEDICAL CORPORATION. USA. HIV-1 Incidence Test. Enzyme Inmunoassay for Population Estimates of HIV-Incidence. 2008.

45. Kassanjee R, McWalter TA, Bärnighausen T, Welte A. A New General Biomarker-Based Incidence Estimator. Epidemiol Camb Mass. 2012;23(5):721–8.

46. UNAIS. Reference Group on Estimates MaP. Statement on the use of the BED-assay for the estimation of HIV-1 incidence for surveillance or epidemic monitoring. [Internet]. 2005. Disponible en: http://www.epidem.org/sites/default/files/content/resources/attachments/BED%20statement.pdf

47. Konikoff J, Brookmeyer R, Longosz AF, Cousins MM, Celum C, Buchbinder SP, et al. Performance of a Limiting-Antigen Avidity Enzyme Immunoassay for Cross-Sectional Estimation of HIV Incidence in the United States. Plos ONE. 2013;8(12):E82772.

48. SEDIA BIOSCIENCE CORPORATION. Comparison of Features of Sedia™ BED.

49. Baker B, Block B, Rothchild A, Walker B. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. Expert Opin Biol Ther. enero de 2009;9(1):55–69.

50. Centers for Disease Control and Prevention. Shipping Guidelines for Dried-Blood Spot Specimens. Laboratory Quality Assurance and Standardization Programs.

51. Curtis KA, Ambrose KM, Kennedy MS, Owen SM. Evaluation of Dried Blood Spots with a Multiplex Assay for Measuring Recent HIV-1 Infection. Ho W, editor. PLoS ONE. el 18 de septiembre de 2014;9(9):e107153.

52. Parekh B. Use of dried blood spot (DBS) with BED testing for recent infection. Paper presented at HIV Diagnostics: New Developments and Challenges. Paper presented at HIV Diagnostics: New Developments and Challenges; 2005.

53. AIDS. Use of dried blood spots to improve the diagnosis and management of HIV in resource-limited settings. 2013.

54. Frometa A, Marrero N, González E, Lugo E, Fernández L, Doménech M. Estudio comparativo de los tres papeles de filtro en los ensayos UMELISA para el tamizaje neonatal de hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria. Rev Biomed. 2002;13:241–7.

55. PA:National Committee for Laboratory Standards. Blood collection on filter paper for neonatal screening programs. 1992.

56. Garcia J, McNulty C, Jennings D, Huang W, Heneine B. Rapid Decline in the Efficiency of HIV Drug Resistance Genotyping from Dried Blood Spots (DBS) and Dried Plasma Spots (DPS) Stored at 37°C and High Humidity. J Antimicrob Che- Motherapy. 2009;64(1):33–6.

57. Anitha D, Sumathi P, MiniJacob S. Comparative of Venous Liquid Blood and Dried Blood for HIV Infection in Infants. Int J Biol Med Res. 2012;3(1):1369–72.

58. Bautisa-Arredondo S, Colchero MA, Romero M, Conde C, Sosa S. Is the HIV Epidemic Stable among MSM in Mexico? HIV Prevalence and Risk Behavior Results from a Nationally Representative Survey among Men Who Have Sex with Men. PLoS ONE. 2013;8(9):e72616.

59. HerpeSelect 2 ELISA IgG. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative detection of human IgG class antibodies to HSV-2. FOCUS Diagnostics; 2011.

60. BAYER. SERODIA TP-PA. Prueba de aglutinación pasiva de particulas de gelatina para la detección de anticuerpos contra Treponema pallidum. México.

61. Harris. Análisis químico cuantitativo. 3a ed. España: Editorial Reverté; 2007. p. 16.

62. Voet. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2a ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2009. p. 100.

63. HEXAGON HIV. 3d Generation immunochromatographic rapid test for the detection of antibodies to Human Immune Deficiency Viruses 1 and 2. Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH;

64. Argimon JM, Jiménez J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 3a. edición. Madrid: ELSEVIER; 2000. p. 341-345.

65. Cerda J, Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. Rev Chil Infectol. 2012;29(2):138–141.

66. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Manual evaluación de pruebas diagnósticas.

67. Dos Santos I. Epidemiología del Cáncer: Principios y Métodos. Francia: IARC; 1994. p. 20-26.

68. Cassol S, Salas T, Arella M, Neumann P, Schechter MT, O'Shaughnessy M. Use of dried blood spot specimens in the detection of human immunodeficiency virus type 1 by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991;29(4):667–671.

69. Youhnovski N, Bergeron A, et al. Pre-cut dried blood spot (PCDBS): an alternative to dried blood spot (DBS) technique to overcome hematocrit impact. Rapid Commun. Mass Spectrom. Rapid Commun Mass Spectrom. 2011;25:2591–8.

70. Déglon J, Thomas A, Mangin P, Staub C. Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: concepts and biomedical applications. Anal Bioanal Chem. el 31 de marzo de 2011;

71. Bencomo JF, Castro A, Marti J, Prates S, Appolinário M, Oliveira A. Comparación de calidad del papel filtro Hahnemuehle FP2992 con el Whatman (S&S) 903 en la conservación de la sangre seca para el estudio poblacional de anticuerpos HIV1+2. DST - J bras Doenças Sex Transm. 2009;21(2):56–9.

72. Chaillet P, Zachariah R, Harries K, Rusanganwa E, Harries A.D. Dried blood spots are a useful tool for quality assurance of rapid HIV testing in Kigali, Rwanda. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2009;103:634–7.

73. Romero A, Martó E, González V, Matas L, AERY Study group. Comparison of two serological tests for the identification of recent HIV infection: Vironostika HIV-1 Microelisa and BED capture enzyme immunoassay. Enferm Infecc Microbiol Clin. septiembre de 2011;29(7):553–5.

74. Kassanjee R, et al. Independent assessment of candidate HIV incidence assays on specimens in the CEPHIA repository. AIDS. 2014;28:2439–49.

75. Maxim Biomedical, Inc. Maxim HIV-1 Limiting antigen avidity EIA. Single well avidity enzyme immunoassay for detection of recent HIV-1 infection. 2013.

76. Hauser A, et al. Improved testing of recent HIV-1 infections with the BioRad Avidity Assay compared to the Limiting Antigen Avidity Assay and BED Capture Enzyme Immunoassay: evaluating using reference sample panels from the German seroconverter cohort. PLoS ONE. 2014;9(6):1–7.

77. Yu H, et al. The recency period for estimation of Human Immunodeficiency Virus Incidence by the AxSYM Avidity assay and BED-Capture Enzyme Immunoassay in the Republic of Korea. Osong Public Health Res Perspect. 2014;5(4):187–92.

78. Longosz A, et al. Incorrect identification of Recent HIV in adults in the United States Using a Limiting-Antigen Avidity Assay. AIDS. el 15 de mayo de 2014;28(8):1227–32.

79. Determine HIV-1/2. Abbott Laboratories; 2003.

80. SERODIA-HIV. Prueba de aglutinación de partículas para la detección de anticuerpos anti VIH-1. FUJIREBIO INC;

11 ANEXOS

ANEXO 1. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE PARA EXTRACCIÓN DE ERITROCITOS PARA RECONSTITUCIÓN DE MUESTRAS EN PAPEL FILTRO Y ALGORITMO RECONSTITUCIÓN SANGRE TOTAL A PARTIR DE SUERO

Fecha y Hora de toma de muestra de sangre 12/11/1015 08:50 hrs en tubos Vacutainers con anticoagulante EDTA X SI * NO_____, se colocaron por 3 min (08:51-08:54 hrs) (3 min) en mezcladora S/P Tube Rocker (Baxter Diagnostics Inc No. de Serie 015902). *Documente con que anticoagulante tomo la muestra: _____.

Las muestras serán preparadas con sangre al 45%-55% de hematocrito. En este proceso se desconoce el hematocrito ya que no se cuenta con biometría hemática del tubo No: _____ muestra (control) _____

Se centrifugaron las muestras a 2500 rpm (2500 rpm) por 5 min (5 min), utilizando centrifuga Thermo Elecon Corporation (Mod CENTRA CL-2 No. de serie 42618485) SI X *NO _____ *Describa equipo utilizado: _____.

Se obtuvieron 450 µl (µl) Tubo No1, 500 µl (µl) Tubo No2, 500 µl (µl) Tubo No3, 650 µl (µl) Tubo No4, se realizaron alícuotas del plasma y se metieron a refrigeración.

LAVADO DE ERITROCITOS

Los eritrocitos fueron lavados en 3 (3 ocasiones) con PBS buffer con pH de 7.4

Se añadió PBS buffer (de casa) SI X **NO____ con pH de (7.4), dependiendo de la cantidad del plasma obtenido. Se añadió PBS buffer 450 µl (µl) Tubo No1, 500 µl (µl) Tubo No2, 500 µl (µl) Tubo No3, 650 µl (µl) Tubo No4.

Se mezclaron por 30 seg (30 seg) en mezcladora S/P Tube Rocker (Baxter Diagnostics Inc No. de Serie 015902).

Se centrifugaron las muestras a 2500 rpm (2500 rpm) por 5 min (5 min), utilizando centrifuga Thermo Elecon Corporation (Mod CENTRA CL-2 No. de serie 42618485) SI X *NO _____ *Describa equipo utilizado: _____.

Se retiró el PBS buffer de cada tubo, se retiraron del Tubo No1: 450 µl (µl), Tubo No2: 500 µl (µl), Tubo No3: 500 µl (µl), Tubo No4: 650 µl (µl).

Se añadió PBS buffer (de casa) SI__X__**NO____ con pH de (7.4), dependiendo de la cantidad del plasma obtenido. Se añadió PBS buffer 450 µl (µl) Tubo No1, 500 µl (µl) Tubo No2, 500 µl (µl) Tubo No3, 650 µl (µl) Tubo No4.

Se colocaron por 30 seg (30 seg) en mezcladora S/P Tube Rocker (Baxter Diagnostics Inc No. de Serie 015902).

Se centrifugaron las muestras a 2500 rpm (2500 rpm) por 5 min (5 min), utilizando centrifuga Thermo Elecon Corporation (Mod CENTRA CL-2 No. de serie 42618485) SI __X___ *NO _____ *Describa equipo utilizado: _____.

Se retiró el PBS buffer de cada tubo, se retiraron del Tubo No1: 450 µl (µl), Tubo No2: 500 µl (µl), Tubo No3: 500 µl (µl), Tubo No4: 650 µl (µl).

Se añadió PBS buffer (de casa) SI__X__**NO____ con pH de (7.4), dependiendo de la cantidad del plasma obtenido. Se añadió PBS buffer 450 µl (µl) Tubo No1, 500 µl (µl) Tubo No2, 500 µl (µl) Tubo No3, 650 µl (µl) Tubo No4.

Se colocaron por 30 seg (30 seg) en mezcladora S/P Tube Rocker (Baxter Diagnostics Inc No. de Serie 015902).

Se centrifugaron las muestras a 2500 rpm (2500 rpm) por 5 min (5 min), utilizando centrifuga Thermo Elecon Corporation (Mod CENTRA CL-2 No. de serie 42618485) SI __X___ *NO _____ *Describa equipo utilizado: _____.

Se retiró el PBS buffer de cada tubo, se retiraron del Tubo No1: 450 µl (µl), Tubo No2: 500 µl (µl), Tubo No3: 500 µl (µl), Tubo No4: 650 µl (µl).

ANEXO 1. ALGORITMO RECONSTITUCIÓN SANGRE TOTAL A PARTIR DE SUERO

Se toman _100 µl_ (100 µl) del paquete rojo total de la muestra control y son colocados en un vial previamente rotulado. Posteriormente se toman _100 µl_ (100 µl) de muestra de suero de la muestra a reconstituir con una micropipeta de 100 µl y son mezclados 3 veces__3__ con ayuda de la micropipeta suavemente en el vial.

Temperatura del refrigerador: _____

Se toma una tarjeta de papel filtro S&S 903 Lot#W011 A01768 SI_X__ *NO____ y círculos del mismo papel filtro, para identificar cada uno de ellos con el número de muestra correspondiente en el caso de utilizar los círculos previamente cortados es necesario tomar medidas de precaución para evitar movimientos de los mismos y se pierda su identificación *Describa papel filtro utilizado: _____

Se dispensan las muestras reconstituidas en los círculos con la siguiente cantidad: uno de __10 µl_ (10 µl) en tarjetas de papel filtro, en cada uno de los círculos previamente marcados dentro de la tarjeta.

Se dejan secar durante (24 Hrs) __4___ a temperatura entre (22-27°C) ___26.1 °C_, con (50%) de humedad relativa del laboratorio. No se cuenta con equipo medidor de humedad relativa en el laboratorio, solo se cuenta con la medición de la humedad de la localidad (Cuernavaca Mor) generada en medios electrónicos __45 %__ humedad.

- Posteriormente se meten a congelación en bolsas de plástico resellables.
- Temperatura: ___5_____°C, para su almacenamiento y posterior procesamiento.

ANEXO 2. PRUEBA DE ELISA Focus HERPESELECT 2 ELISA IgG

PLACA 1

MATERIAL REQUERIDO

El kit contiene material para realizar 96 determinaciones. Los reactivos deben ser colocados a temperatura ambiente antes de ser utilizados. Todos los reactivos abiertos pueden permanecer estables a una temperatura de 2 a 8 °C hasta la fecha de expiración.

a. Pozos con antígeno, 96 pozos
b. IgG conjugado de 16 m
c. IgG control positivo alto de 0.3 ml
d. IgG control positivo bajo de a0.3 ml
e. Control negativo de 0.3 ml
f. Calibrador de punto de corte IgG de 0.3 ml
g. Diluyente de muestra de HerpesSelect ELISA, 100 ml
h. Wash buffer 10X, 100 ml
i. Reactivo sustrato, 16 m
j. Reactivo de paro, 16 ml
k. Cinta selladora
l. Lavabo
m. Mezclador Vortex o equivalente.
n. Espectofotómetro para placas de ELISA, con una longitud de onda 450 nm.
o. Procesador automatizado de ELISA (opcional).

MATERIAL REQUERIDO, NO SUMINISTRADO EN EL KIT

a. Agua destilada
b. 250 o 500 ml de agua embotellada o EIA lavador automático para placas.
c. Cilindro graduado de 1L.
d. 12x75 mm tubos de vidrio borosilicato o su equivalente.
e. Pipetas de 10 µl y de 100 µl con puntas desechables, se recomienda pipeta multicanal de 8 para correr arriba de 48 pozos.
f. Pipeta de 1 ml o dispensador
g. Pipeta de 5 ml
h. Cronómetro.
i. Toallas de papel o papel absorbente.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Es un kit para uso de diagnóstico *in vitro* solamente.
2. Todos los productos derivados de sangre deben ser tratados como potencialmente infecciosos. Los controles, muestras de suero y equipo que entre en contacto con las muestras debe ser considerada como potencialmente infeccioso y ser descontaminado o desechado de acuerdo a lo establecido en residuos peligrosos biológico infecciosos.
3. Los pozos de antígeno son producidos con antígenos inactivados de HSV-2. Posterior a la adición de las muestras de los pacientes o controles, las tiras deben ser consideras potencialmente infecciosas y deben ser manejadas de manera adecuada.

4. La azida de sodio en una concentración de 0.1% fue añadida a algunos reactivos como agente antibacterial. Para prevenir la formación de explosión de metales con la azida con el cobre y plomo en las tuberías, estos reactivos deben ser desechados en el drenaje solamente si han sido diluidos y se descargan con grandes cantidades de agua. Los sistemas de drenaje deben estar libres de cobre y plomo. Ocasionalmente se debe descontaminar el drenaje con hidróxido de sodio al 10%, deje actuar por 10 min y después vierta grandes volúmenes de agua.
5. No sustituya ninguno de los reactivos con otros reactivos de kits diferentes o de otros proveedores.
6. Solamente utilice el protocolo descrito en este inserto. Periodos de incubación o temperaturas diferentes a las especificadas en el inserto pueden dar resultados erróneos.
7. Se pueden dar resultados erróneos por contaminación cruzada con las muestras de pacientes. Añada y maneje las muestras de pacientes y tiras con cuidado para evitar mezclarlas con suero de pozos en incubación. Decante con cuidado.
8. La contaminación bacteriana de las muestras de suero puede producir resultados erróneos. Utilice técnicas de asepsia para prevenir la contaminación microbiana.
9. Desarrolle la prueba en temperatura ambiente (aproximadamente en un rango de 20 a 25 °C).
10. Use adecuadas técnica de pipeteo, mantenga los patrones de pipeteo a lo largo del procedimiento para asegurar valores óptimos y reproducibles.
11. El agente de paro contiene ácido sulfúrico, no permita el contacto de este con los ojos o con la piel. Si se expone, enjuague con cantidades de agua abundante.

RECOLECCIÓN DE MUESTRA Y PREPARACIÓN

El suero es la fuente de las muestras, hasta el momento no se ha intentado realizar la prueba con otras muestras compatibles. Suero contaminado, hiperlipemico, hemolizado, o inactivado por calor puede causar resultados erróneos, por lo tanto se debe evitar su uso.
Recolección y manejo de las muestras: la recolección de la muestra debe realizarse de manera aséptica utilizando técnicas de venipunctura por personal cualificado. Permita que las muestras de sangre formen un coagulo a temperatura ambiente previo a centrifugación. Transfiera el suero de manera aséptica a un contenedor estéril para almacenaje. El suero separado puede permanecer a 22°C por no más de 8 hrs. Si la prueba no es completada dentro de las próximas 8 hrs, debe refrigerarse entre 2 y 8 °C. Si la muestra no es completada dentro entre 48 hrs, o se realizará envió de muestras, congélelas a -20°C o menos. Descongele y mézclelas antes de utilizarlas.
Muestras, controles y preparación de calibradores: diluya cada espécimen, control y calibrador 1:101. Por ejemplo: rotule los tubos y dispense 1000 µl del diluyente de muestra en cada uno de los tubos rotulados. Añada 10 µl de muestra, control o calibrador en cada tubo correspondiente que contiene 1000 µl de diluyente de muestra y mezcle bien con el uso de un vortex.

Día 1 **Fecha:29/09/2015**

Elusión de muestras en papel filtro:

1. Se colocó con una pinza 1 (1) solo círculo de cada una de las muestras a cada pozo según corresponda.
2. Se agregaron 400 µl (400 µl) de diluyente de muestra (solución PBS con ph 7.4) a todos y c/u de los pozos con una micropipeta.

3. Se cubrió la placa con el sello adhesivo o los criotubos debidamente identificados e incubar de 2 a 8 °C por 12 a 16 hrs, para su elusión:
    a. Hora de inicio de incubación de elución 15:40 hrs Temperatura: 4.2° C
    b. Hora de finalización de incubación de elución: 07:40 hrs Temperatura: 4.4°C Fecha: 30/09/2015

Día 2 **fecha 29/09/2015**

PROCEDIMIENTO **Placa NO 1C/PC**

1. Para este caso de muestras eluidas se retiró el papel filtro, una vez eluidas con la ayuda de una punta.
2. Se trajeron todos los reactivos a temperatura ambiente antes de uso. Se removió el antígeno de refrigeración. Para evitar condensaciones, se permito que las tiras alcanzarán la temperatura ambiente antes de abrir el paquete de aluminio. A menos de que una placa completa sea utilizada, regrese las tiras al paquete de aluminio con desecante y resellelo completamente. Los reactivos que no se estuvieron utilizando fueron guardados entre 2 y 8°C.
3. Se diluyeron las muestras 1:101 como se indicó antes.
4. **OPCIONAL.** 5 minutos pre-remojar. Si se omite, proceda al paso 3. Rellene los pozos con Buffer de Lavado 1X NO (100 µl) y remoje por 5 minutos. Decante o aspire el antígeno de los pozos y golpee vigorosamente para remover el Wash buffer 1X. Hacer blot a los pozos vacíos de antígeno boca abajo en una toalla de papel limpia o papel absorbente para remover el Wash Buffer 1X.
5. Se dispensaron 100 µl (100 µl) del diluyente en el pozo "vacío" (blanco) y 10 µl (100 µl) del espécimen, control o calibrador a cada uno de los pozos especificados (mapa). (Nota: para corridas de más de 48 pozos se recomienda que se añadan 250 µl de cada muestra diluida primero a una placa blanco de micropipeta en su localización correspondiente de los pozos de ELISA. Las muestras pueden ser transferidas eficientemente a los pozos de los antígenos con 100 µl en una pipeta multicanal de 8 o 12).
6. Los platos deben cubrirse con cinta selladora (o ser colocados en una cámara humidificadora) y ser incubados a 60 ± 1 minuto a temperatura ambiente (20-25°C).
    a. Hora de inicio de incubación/muestras: 10:19 hrs Temperatura: 21.3°C
    b. Hora de finalización de incubación/muestras: 11:25 hrs. Temperatura: 21.9°C
7. Preparación del buffer 1X 50 ml (100 ml) wash buffer 10 X 900 (900 ml de agua desionizada)
8. Se mezcló en una probeta.
9. Se removió la cinta selladora (o remueva los pozos de la cámara humidificadora) y después se vació el contenido en un recipiente para clorarlo y posteriormente vaciarlo en el lavabo después de 30 min.
10. Llene cada pozo con una corriente gentil de Wash buffer 1X solución de una botella - (250-300 µl), después vacié el contenido en un recipiente para clorarlo y posteriormente vaciarlo en el lavabo después de 30 min. Deje reposar 30 segundos entre los 2 lavados.
11. Se repitió el lavado (paso 6) 2 veces más. Este proceso de lavado puede realizarse automáticamente en un lavador de placas de ELISA, generando un protocolo de lavado bajo estas mismas condiciones.

12. Se golpearon los pozos con antígeno de manera vigorosa para remover el Wash Buffer 1X. Haga blot de la placa boca abajo en toallas de papel limpio o papel absorbente para remover el Wash Buffer 1X residual.
13. Se dispensaron 100µl (100µl) de conjugado en todos los pozos, utilizando una pipeta de 100 µl multicanal de 8-12.
14. Se cubrió la placa con cinta selladora (o colóquelas en una cámara humidificadora) e incubada por 30 ±1 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
    a. Hora de inicio de incubación de conjugado 11:45 hrs Temperatura: 22.1°C
    b. Hora de finalización de incubación de conjugado: 12:18 hrs Temperatura: 22.5°C

15. Se repitieron los pasos de lavado del 5 a 8.
16. Se pipeteó 100 µl (100 µl) de reactivo de sustrato en todos los pozos, utilizando una pipeta de 100µl multicanal de 8-12. Se inició el tiempo de incubación con la adición del reactivo de sustrato al primer pozo. (nota: nunca vacié el reactivo de sustrato en el mismo que fue utilizado para el conjugado).
17. Se incubo por 10 ± minuto a temperatura ambiente (20-25°C). Se cubrió de la luz directa.
    a. Hora de inicio de incubación de sustrato 12:29 hrs Temperatura: 22.5°C
    b. Hora de finalización de incubación de sustrato: 12:39 hrs Temperatura: 22.4°C

18. Se paró la reacción añadiendo 100 µl (100 µl) de reactivo de paro en todos los pozos utilizando una pipeta de 100 µl multicanal de 8-12. Se añadió el reactivo de paro en la misma secuencia y el mismo paso en el que el sustrato fue añadido. En los pozos con anticuerpos positivos, el color debe cambiar de azul a amarillo. Hora de lectura: 13:02 hrs
19. De manera gentil se hizo blot en el fondo de los pozos con una toalla de papel para remover gotas que puedan interferir en la lectura de espectrofotometría. No frote con toalla de papel ya que puede rasguñar la superficie óptica del pozo. (NOTA: burbujas grandes en la superficie del líquido pueden afectar las lecturas de densidad óptica).
20. Se midió la absorbancia de cada pozo dentro de 1 hora de haber detenido el ensayo. Se estableció la longitud de onda del espectrofotómetro a 450 nm. Se puso el instrumento en cero en los pozos vacíos, o corrija todos los ODs de manera manual sustrayendo los ODS en blanco.
21. La lectura se hizo dentro de la hora posterior al reactivo de paro.

CONTROL DE CALIDAD

Al correr cada paca debe incluir el punto de corte del calibrador y los 3 controles. Si se corren múltiples placas, incluir el punto de corte del calibrador y todos los 3 controles en cada placa.
El valor de la media para el punto de corte del calibrador debe estar entre 0.100 y 0.700 unidades de OD. Todos las réplicas del punto de corte del calibrador deben estar entre 0.10 unidades de absorbancia del valor de la media.

El reporte de resultados de los valores índices es relativos al punto de corte del calibrador. Para calcular los valores índices, se divide el valor del espécimen OD entre el valor de la media de absorbancia del punto de corte del calibrador.

1. El índice del control positivo alto debe ser mayor a 3.5
2. El índice del control positivo bajo debe estar entre 1.5 y 3.5
3. El índice del control negativo debe ser menor a 0.8.

Si el calibrador o los controles no se encuentran dentro de estos parámetros, los resultados del paciente deben de considerarse inválidos y el ensayo ser repetido.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA

Para calcular los valores índices, dividir la densidad óptica del espécimen entre la media del valor de punto de corte del valor de absorbancia.

PUNTO DE CORTE	**RESULTADO**
>1.10	**POSITIVO.** Un valor índice >1.10 es presuntivo para la presencia de anticuerpos IgG para HSV-2
≥0.90 y ≤1.10	**EQUIVOCO.** Un valor índice ≥0.90 pero ≤1.10 es considerado en resultado equivoco. Estas muestras deben ser probadas nuevamente. Si en una prueba nueva, vuelve a salir equivoca, se debe probar de nuevo de 4 a 12 semanas después. O el espécimen debe ser probado utilizando otro método como Western Blot.
<0.90	**NEGATIVO.** Un valor índice <0.90 indica que no hay anticuerpos IgG detectados para HSV-2.

1. Todos los resultados de esta y otras serologías deben ser correlacionados con la historia clínica, datos epidemiológicos y otros datos disponibles del médico que atiende a los pacientes.
2. La prevalencia de la infección afectará el valor predictivo de la prueba.
3. Como en otras pruebas serológicas, los resultados negativos no descartan el diagnóstico de enfermedad por herpes simple. El tiempo requerido para seroconversión en infección primaria varía en cada individuo. Cuando sea apropiado en enfermedad sospechosa de herpes, la prueba debe ser repetida o probada con una prueba diferente. Si cuando se repite la prueba, si el resultado continúa negativo entonces una segunda muestra debe ser tomada 4 a 12 semanas después y repetir la prueba.
4. Los resultados falsos negativos pueden ocurrir cuando el virus infectante es deficiente de IgG, o porque se desconoce si el antígeno de la prueba fue glicosilado al igual que células mamarias. Liljevquist reporto alrededor de 0.2% (5/2400) aislados donde la IgG fue deficiente).

5. Como con otras pruebas serológicas, resultados falsos positivos pueden ocurrir. La repetición de pruebas o probarlas con diferentes aparatos puede estar indicado en algunas circunstancias, como pacientes con una baja probabilidad de infección por HSV.
6. Un solo resultado positivo indica previa exposición inmunológica, el nivel de respuesta de anticuerpos o la respuesta de clase de anticuerpos puede no ser utilizada para determinar infección reciente o un estadio de la enfermedad.
7. La magnitud del valor índice por arriba el valor de corte no indica la cantidad total de anticuerpos presentes.
8. La serología no puede distinguir infecciones genitales de las orales. Cuando sea apropiado el cultivo se recomienda para determinar el sitio de infección. Sin embargo los cultivos falsos negativos son comunes, especialmente en pacientes con infección recurrente o con lesiones en curación.

LIMITANTES

El desarrollo de la prueba no ha sido establecido para la población general.

1. El desarrollo de la prueba no ha sido establecido para otras enfermedades con síntomas similares, como *Candida albicans*, Bacterioides especies *G. vaginalis,* especies de Mobiluncus. En ese caso se requiere un cultivo u otros métodos más apropiados.
2. El desarrollo de la prueba no ha sido establecido para otras matrices a parte del suero, o determinación visual del resultado o monitorear el tratamiento de HSV-2.

VALORES ESPERADOS

Los cálculos están basados en Focus Diagnostics HerpeSelect 2 ELISA IgG encontrando

1) Sensibilidad hipotética del 96.1% y una especificad hipotética del 97.0% (en adultos sexualmente activos).
2) Sensibilidad hipotética del 100% y una especificidad hipotética del 96.1% (mujeres embarazadas).

ANEXO 3. PROCEDIMIENTO MEDICIÓN PROTEINAS TOTALES MUESTRAS DE SANGRE TOTAL Y SUERO EN PAPEL FILTRO CON NANODROP ESPECTOFOTOMETRÍA

NANODROP 1006/ Thermo Scientific
TIPO: PROTEIN A280

1. Se abrió la aplicación del Nanodrop en la computadora y se eligió el programa Protein A280.
2. Se realizó limpieza del Nanodrop con 1.5 µl (1-2 µl) agua 5 veces destilada.
3. Se realizó limpieza del lector óptico con papel.
4. Se realizó una medición con 1.5 µl (1-2 µl) de blanco diluyente de muestra buffer.
5. Se realizó limpieza del lector óptico con papel.

6. Se inició lectura de muestras de suero con 1.5 µl (1-2 µl), entre cada muestra se realizó limpieza lector óptico con papel.
7. Posterior a la medición de 10 muestras de suero, se realizó medición con una muestra de control 1.5 µl (1-2 µl).
8. Se realizó una medición con 1.5 µl (1-2 µl) de blanco diluyente de muestra buffer.
9. Se continuo con la medición de las muestras de suero y se repiten pasos 7 y 8.
10. Al finalizar las mediciones correspondientes se realizó la limpieza del Nanodrop con 1.5 µl (1-2 µl) agua 5 veces destilada.
11. Se anotó en la bitácora el horario en el que se trabajó con el equipo y el número de muestras con las que se trabajó.

ANEXO 4. SERODIA TP-PA. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN PASIVA DE PARTICULAS DE GELATINA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Trepona pallidum*

Principio del procedimiento

El kit Serodia TP-PA se fabrica utilizando acarreadores de partículas de gelatina sensibilizadas con antígenos de *Treponema pallidum* purificado (cepa Nichols). La prueba se basa en la aglutinación de partículas sensibilizadas en presencia de anticuerpos contra *Treponema pallidum* en suero o plasma humano.

Propósito de la prueba

SERODIA TP-PA es una prueba *in vitro* de aglutinación pasiva de partículas de gelatina para la detección de anticuerpos de *Treponema pallidum* en especímenes de suero o plasma.

Ventajas del método

1. Procedimiento de prueba simple: la prueba no requiere equipo especial y el procedimiento requiere una microplaca estándar en forma de “U”, esto es factible tanto para analizar un pequeño número de especímenes como para una discriminación en masa.
2. Tiempo de reacción corto: los procedimientos permiten hacer interpretaciones visuales a las 2 horas de incubación.
3. Alta especificidad: el kit utiliza partículas artificiales específicamente desarrolladas por FUJIREBIO INC como acarreadores. Estas partículas disminuyen la aglutinación no específica usualmente observada con el uso de otros acarreadores.

Componentes de la caja

MAXIMO DE PRUEBAS	REACTIVOS				
	Solución para reconstituir	Diluyente de muestra	Partículas sensibilizadas	Partículas no sensibilizadas	Control positivo
100 pbas (20x5)	1 vial x 8ml	1 vial x 29ml	5 viales x 0.6ml*	5 viales x 0.6ml*	1 vial x 0.5ml
220 pbas (55x4)	1 vial x 18ml	1 vial x 60ml	4 viales x 1.5ml*	4 viales x 1.5ml*	1 vial x 0.5ml
550 pbas (110x5)	2 viales x 18 ml	2 viales x 60ml	5 viales x 3ml*	5 viales x 3ml*	1 vial x 0.5ml
600 pbas (300x2)	2 viales x 18 ml	2 viales x 60ml	2 viales x 8ml*	2 viales x 8ml*	1 vial x 0.5ml

Descripción de los reactivos

a) Solución para reconstituir (líquida): se utiliza para la reconstitución de las partículas sensibilizadas y las no sensibilizadas. Este reactivo contiene 0.06% (p/v) de azida sódica como conservador.
b) Diluyente de muestra: (líquido): se utiliza para la dilución de especímenes. Este reactivo contiene 0.1% (p/v) de azida sódica como conservador.
c) Partículas sensibilizadas (liofilizado): preparación de liofilizado de partículas de gelatina recubiertas con *Treponema pallidum;* se reconstituye con la adición de la cantidad indicada de "solución para reconstituir". La solución reconstituida contiene 0.079% (p/v) de azida sódica como conservador.
d) Control positivo (líquido): este control se prepara a partir de suero de conejo, el cual contiene anticuerpos para *Treponema pallidum.* El control debe mostrar un título de 1:320 (dilución final), cuando se analiza de acuerdo al procedimiento descrito en la tabla 1. Este reactivo contiene 0.099% (p/v) de azida sódica como conservador.
e) Accesorios:
goteros de 25 µl: 2 goteros (20x5, 55x4, 110x5)
4 goteros (300x2)

Otros materiales requeridos (no proporcionados en el kit)

1. Microplaca
2. Dilutores……25 µl (0.025 mL)
3. Goteros calibrados……..25 µl (0.025 mL)
4. Pipetas……..micropipetas y pipetas volumétricas
5. Goteros
6. Agitador (con movimiento vibratorio, no rotatorio)

7. Placa para visualizar
8. Hisopos

Preparación de los reactivos

1. **Preparación de especímenes:** eritrocitos y otros componentes visibles presentes en las muestras de suero o plasma, deben ser removidas por centrifugación antes de iniciar la prueba, para prevenir interferencias con los resultados. La inactivación sérica no afecta el resultado de la prueba. No inactive el plasma.
2. **Reconstitución de partículas liofilizadas:** se reconstituyen las partículas sensibilizadas y no sensibilizadas con la cantidad indicada de solución para reconstituir respectivamente a la temperatura ambiente (15-30°C), 30 minutos antes de ser utilizados. Para obtener resultados confiables asegúrese de homogeneizar perfectamente las partículas sensibilizadas y no sensibilizadas antes de la prueba.

Procedimiento para el análisis:

(1) Procedimiento para la prueba cualitativa:

1. Coloque 4 4 gotas (100 µL) del diluyente de muestra en el pozo No.1 y 1 1 gota (25 µL) del pozo No.2 hasta el No. 4 usando una pipeta gotero calibrada. Pasos 2 y 3 (cambian según el experimento)
2. Adicione _____ 25 µL de la muestra al pozo No. 1 usando una micropipeta.
3. Llene la micropipeta o dilutor con _____ 25 µL de la solución diluida en el pozo No. 1 y mezcle bien. Transfiera _____(25 µL) de la mezcla de la muestra y el diluyente de la muestra al pozo No. 2 mezcle bien y repita este procedimiento otra vez con los pozos No. 2,3,y 4 para obtener una serie doble de diluciones.
4. Se colocó 1 una gota (25 µL) de partículas no sensibilizadas en el pozo No. 3; 1 una gota (25 µL) de partículas sensibilizadas en el pozo No. 4, utilizando los goteros proporcionados en el kit.
5. Se mezclaron los contenidos de los pozos vigorosamente (durante aproximadamente 30 (30 segundos) usando una placa con agitación vibratoria (automático). No utilizar un mezclador rotatorio. Después cubra la placa y deje reposar a temperatura ambiente 25.5°C (15-30°C) durante 2 2 horas antes de leer. La incubación puede ser prolongada durante toda la noche, sin ninguna diferencia perceptible en los patrones.

TABLA 1. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA CUALITATIVA

POZO NO.	1	2	3	4
Diluyente de muestra (µL) Muestra (µL)	100 25	25 25	25 25	25 25
Diluciones de la muestra	1:05	1:10	1:20	1:40
Partículas no sensibilizadas (µL)		x	25 x x	
Partículas sensibilizadas (µL)		x		25 x x
Dilución final			1:40	1:80
Mezcle, cubra la placa e incube por 2 horas				
Interpretación				

Experimento 1 (x), Experimento 2 (x), Experimento 3 (x)

Se recomienda que especímenes que muestran reacciones positivas y/o definidas en la prueba cualitativa, sean confirmadas con la prueba cuantitativa para una interpretación exacta.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Coloque la microplaca cuidadosamente en una placa para visualización, compare los patrones de aglutinación con los reactivos control e intérprete de acuerdo al criterio mostrado en la tabla 3.

TABLA 3 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

ESTABLECIIENTTO DE PATRONES DE PARTÍCULAS	LECTURA	INTERPRETACIÓN
Partículas concentradas formando un botón en el centro del pozo, con un rededor liso en el margen exterior.	**-**	No reactivo
Partículas concentradas en forma de un anillo compacto con un rededor liso en el margen exterior.	**±**	Dudoso
Un gran anillo bien definido con rugosidad, margen exterior multiforme y aglutinación periférica	**+**	Reactivo
Partículas aglutinadas dispersas cubriendo el fondo del pozo uniformemente.	**++**	Reactivo

CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN

1) **REACTIVO:** una muestra de reacción negativa con partículas no sensibilizadas (dilución final 1:40) pero que muestra aglutinación con partículas sensiblizadas (dilución final 1:80), es considerada como reacción positiva en esta prueba.
2) **NO REACTIVO:** un espécimen que muestra una “no reacción” con las partículas no sensibilizadas (dilución final 1:80), es considerada como resultado no reactivo.
3) **DUDOSO:** una muestra que reacciona negativamente con las partículas no sensibilizadas (dilución final 1:80), es considerada como una reacción “dudosa”. En este caso se recomienda realizar una prueba cuantitativa para su interpretación exacta. Si al hacerlo la prueba resulta nuevamente “dudosa” y es discrepante con el resultado inicial, se recomienda se realice una prueba confirmatoria con otros métodos como el FTA-ABS.

PROCEDIMIENTO DE ABSORCIÓN

Si una muestra produce aglutinación tanto con partículas sensibilizadas como con partículas no sensibilizadas, o bien da un resultado “dudoso”, se debe repetir la prueba después del siguiente procedimiento de absorción:

1. Deposite ____(0.95 mL) de partículas reconstituidas no sensibilizadas en un pequeño tubo de ensaye.
2. Adiciones _____(50 µl) de la muestra en un tubo y mezcle vigorosamente. Incube a temperatura _____(15-30°C) por _____ 20 minutos o más.
3. Centrifugue por _____5 minutos a _____2000 rpm. Tome el sobrenadante_____ (muestra diluida 1:20 absorbida) cuidadosamente y coloque _____ (50 µl) en el pozo No. 3 de la microplaca.

4. Coloque una gota _____(25 µl) del diluyente de la muestra del pozo No. 4 al 12. Usando un dilutor o micropipeta, prepare una serie de diluciones dobles desde el pozo No. 3 al 12.
5. Siga el mismo procedimiento de la tabla 2 y lea el resultado.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1) Sensibilidad: el control positivo proporcionado en este kit, no debe exceder o ser menos que una dilución doble, a partir del título del punto final (1:320).
2) Especificidad: los sueros de control interno (un total de 6 muestras, 3 reactivos y 3 no reactivos) muestran los resultados esperados cuando los procedimientos de prueba se realizan de acuerdo al instructivo del producto.
3) Reproducibilidad: cuando una muestra reactiva fue probada 5 veces consecutivas, de acuerdo al procedimiento de prueba, todos los resultados fueron encontrados dentro de ± una variación de un pozo. (una doble dilución).

CORRELACIÓN DE RESULTADOS

Los estudios de correlación fueron realizados por comparación de los resultados para SERODIA TP-PA Y SERODIA-TP en 391 muestras. Se obtuvo la siguiente correlación:
Número de muestras=391
Correlación dentro de ± una doble dilución: 100%

PRECAUCIONES

A. PRECAUCIONES DE MANEJO

1. Cuando una muestra llega a ser “reactiva o dudosa” en la prueba cualitativa, la muestra debe ser analizada nuevamente con la prueba cuantitativa. Si al repetir la prueba, la muestra es “reactiva o dudosa”, el resultado deber ser confirmado por otros métodos (FTA-ABS).
2. El kit está diseñado con el sólo propósito de detectar anticuerpos contra *Treponema pallidum* en muestras de suero o plasma. El kit no detecta *Treponema pallidum* directamente. Los resultados de la prueba no deben ser utilizados en forma aislada, se debe usar en conjunto con los síntomas del paciente, historia clínica y algunos otros datos disponibles para dar un diagnóstico acertado.
3. Los reactivos contienen azida sódica como conservador, la cual se sabe que puede formar un compuesto explosivo al desecharse por tuberías de plomo y cobre; para prevenir que esto suceda, enjuague con grandes volúmenes de agua al desechar los reactivos. Asimismo si se pone en contacto con la piel, lave abundantemente la zona.

B. PRECAUCIONES DE PROCEDIMIENTO

1. Después de adicionar partículas sensibilizadas y no sensibilizadas dentro de los pozos de la microplaca, mezclar los contenidos de pozos, vigorosamente.
2. Durante la incubación, cubrir la microplaca y mantener libre de vibración.
3. El aseguramiento de la calidad esta dado para cada lote de producción. No usar reactivos de diferentes lotes para la misma prueba.

4. Los especímenes (muestras) y reactivos de este kit pueden ser transmisores potenciales de VIH, VHB, VHC y otros microorganismos peligrosos, por lo que deben ser manejados cuidadosamente y con mucha precaución. Todos los accesorios y equipos usados (como pipetas, tubos, etc), deben ser descontaminados con una solución de hipoclorito de sodio de 1000 ppm (0.1%) de cloro, dejar remojar por lo menos durante una hora; solución al 2% de glutaraldehido por más de una hora, esterilizada en autoclave a 121°C por más de una hora o incineración.
5. Es ideal que los reactivos liofilizados contenidos en el kit, pueden ser utilizados en el mismo día de su reconstitución. Sin embargo, bajo condiciones apropiadas de almacenamiento 275-283 K (2-10°C) pueden permanecer estables por 7 días después de su reconstitución.
6. Evite la contaminación de los reactivos y muestras con saliva, la cual puede causar patrones de aglutinación indistinguibles. No pipetee con la boca los reactivos.

Las muestras de pacientes inyectados con derivados de la sangre (preparaciones que incluyen inmunoglobulinas), pueden dar reacciones positivas.

ANEXO 5. PRUEBA HEXAGON HIV

La prueba puede emplearse con sangre total, plasma y suero. Si se utiliza sangre total de la yema del dedo, recoger 20 µl y pipetearla directamente en la zona reactiva del test. Tocar la almohadilla de muestra con la punta de pipeta; o hacer gotear la muestra apretando el tubo capilar. La muestra debe absorberse completamente y no debe utilizarse sangre hemolítica. (63)

Las muestras de suero o de plasma (10 µl) deberían aplicarse con pipetas estándar de laboratorio. Las muestras pueden almacenarse hasta 3 días entre 2-8°C

Procedimiento

1. Antes de comenzar el ensayo, las muestras de los kits y el diluyente deben llevarse a la temperatura ambiente (15-25°C).
2. Extraer el kit de la bolsa.
3. Rotula el test para identificar al paciente.
4. Sosteniendo la pipeta verticalmente, depositar 20 µl de sangre total o 10 µl de suero o plasma en la ventana de muestra en la parte inferior del dispositivo.
5. Agregar 3 gotas (aproximadamente 120 de diluyente a la ventana de muestra).
6. Leer los resultados dentro de 5-20 minutos. Las muestras muy reactivas producirán una línea de prueba ya después de algunos minutos. Las muestras de baja reactividad pueden requerir un periodo más largo de incubación hasta un máximo de 20 minutos. La prueba no se debe interpretar sin transcurren más de 20 minutos.

Interpretación de resultados

Negativo

Sólo la línea de control (C) coloreada aparece en la parte superior de la ventana rectangular indicado la realización apropiada del ensayo y el funcionamiento correcto de los reactivos.

Positivo

Aparición de una o dos líneas coloreadas adicionales debajo de la línea (C) de control indica un resultado positivo para anticuerpos del VIH-1 (línea en 1) y/o del VIH-2 (línea en 2) en la muestra. Debido a una reactividad cruzada importante, los anticuerpos anti-VIH-1 pueden reaccionar con los antígenos del VIH-2 y viceversa, y en ocasión, dos líneas coloreadas pueden aparecer, aunque la infección ha sido causada por sólo un tipo de virus.

No. Muestra	**Interpretación de resultados**		
	Negativo	**Positivo**	**No válido**
ECO 362-4		**X**	
ECO 229-4		**X**	
ECO 321-4		**X**	
ECO 075-4		**X**	
ECO 272-4		**X**	

Aún una línea débil debe interpretarse como resultado reactivo. Intensidades diferentes entre la línea de control y las líneas de prueba pueden ocurrir, pero éstas son irrelevantes para la interpretación.

Si no aparece ninguna línea de control, aun si aparece una línea de prueba, repita la prueba con nuevo kit de prueba.

Se realizaron experimentos con muestras de la Clínica Especializada Condesa de un estudio previo de HSH y de las cuales se contaba con el diagnóstico previo de VIH.

Experimento #1

1. Antes de comenzar el ensayo, las muestras de los kits y el diluyente deben llevarse a la temperatura ambiente (15-25°C).
2. Extraer el kit de la bolsa.
3. Rotula el test para identificar al paciente.
4. Sosteniendo la pipeta verticalmente, depositar 10 µl (10 µl) de suero o plasma en la ventana de muestra en la parte inferior del dispositivo.

5. Agregar 3 gotas 120 µl (aproximadamente 120 µl de diluyente a la ventana de muestra).
6. Leer los resultados dentro de 5-20 minutos. Las muestras muy reactivas producirán una línea de prueba ya después de algunos minutos. Las muestras de baja reactividad pueden requerir un periodo más largo de incubación hasta un máximo de 20 minutos. La prueba no se debe interpretar sin transcurren más de 20 minutos.

Experimento #2

En este experimento se utilizó como diluyente el buffer del kit de la prueba BED-CEIA. (120 µl)

Procedimiento

1. Antes de comenzar el ensayo, las muestras, los tests y el diluyentes deben llevarse a temperatura ambiente (12-25°C).
2. Extraer el test de la bolsa
3. Rotular el test para identificar al paciente.
4. Sosteniendo la pipeta verticalmente, depositar 10 µl (10 µl) de suero en la ventana de la muestra (S) en la parte inferior del dispositivo.
5. Agregar 3 gotas de diluyente (buffer prueba BED-CEIA) a la ventana de la muestra 120 µl (120 µl) aproximadamente.
6. Leer los resultados dentro de los 5…20 minutos. Las muestras muy reactivas producirán una línea de prueba ya después de algunos minutos. Las muestras de baja reactividad pueden requerir un periodo más largo de incubación hasta un máximo de 20 minutos. Sin embargo, no interprete las pruebas si transcurren más de 20 minutos.

Experimento #3

En este experimento se utilizó como diluyente el buffer de la prueba BED-CEIA.

Procedimiento

1. Antes de comenzar el ensayo, las muestras, los tests y el diluyentes deben llevarse a temperatura ambiente (12-25°C).
2. Extraer el test de la bolsa
3. Rotular el test para identificar al paciente.
4. Sosteniendo la pipeta verticalmente, depositar 2.3 µl (2.3 µl) de suero en la ventana de la muestra (S) en la parte inferior del dispositivo.
5. Agregar gotas de diluyente (buffer de prueba BED-CEIA) a la ventana de la muestra 280 µl (280 µl) aproximadamente.
6. Leer los resultados dentro de los 5…20 minutos. Las muestras muy reactivas producirán una línea de prueba ya después de algunos minutos. Las muestras de baja reactividad pueden requerir un periodo más largo de incubación hasta un máximo de 20 minutos. Sin embargo, no interprete las pruebas si transcurren más de 20 minutos.

ANEXO 6. PRUEBA DETERMINE HIV1/2

Es un inmunoanálisis cualitativo *in vitro* de lectura visual para la detección de anticuerpos frente a los virus VIH-1 y VIH-2 en suero, plasma o sangre humana. (79)

La muestra se añade a la superficie absorbente del kit. Mientras la muestra traspasa el área del conjugado, lo reconstituye y se mezcla con el conjugado de coloide de selenio-antígenos. Esta mezcla se mueve por la fase sólida hasta llegar a los antígenos recombinantes y péptidos sintéticos inmovilizados en la ventana de resultados del paciente. Si los anticuerpos anticuerpos frente al VIH-1 y/o a la VIH-2 están presentes en la muestra, se unen al coloide de selenio-antígenos y a los antígenos de la ventana de resultados del paciente formándose una barra roja en esta ventana.

Almacenamiento: las tarjetas de ensayo Abbott Determine HIV-1/2 y el tampón de arrastre deben almacenarse a una temperatura entre 2°C y 30°C hasta la fecha de caducidad.

Procedimiento del ensayo

1. Retire el plástico de la protección de los ensayos
2. Para muestras de suero o plasma:
    a. Dispense 50 µl de muestra (con una pipeta de precisión) en la superficie absorbente (señalada con una flecha).
    b. Espere un mínimo de 15 minutos y un máximo de 60 minutos para leer el resultado.

Control de calidad
Para asegurar la validez de los resultados, este ensayo incorpora un control de procedimientos (“Control”). Si la barra de control no se torna de color rojo al finalizar el ensayo, el resultado no es válido y la muestra se debe volver a analizar.

Interpretación de resultados

POSITIVO (2 barras)
Tanto en la ventana (“Control”) como en la ventana de resultados del paciente (“Patient”) aparecen barras rojas. Cualquier tipo de tonalidad roja que pueda aparecer en la ventana de resultados del paciente implica que el resultado es positivo.

NEGATIVO (1 barra)
En la ventana de control (“Control) aparece 1 barra roja y en la ventana de resultados del paciente (“Patient”) no aparece una barra roja.

NO VÁLIDO (Ninguna barra)
Si no aparece una barrar roja en la ventana de control del ensayo, aunque haya aparecido una barra roja en la ventana de resultados del paciente, el resultado no es válido y el ensayo se debe repetir.

NOTA. El resultado del ensayo es positivo aunque el tono de la barra de la ventana de resultados del paciente se más claro o más oscuro que el de la barra de la ventana de control.

PROCEDIMIENTO

1. Se depositó en la tira reactiva 50 µl (50 µl) de muestra de suero control y se realizó la lectura a los 15 min.

2. Se depositó en la tira reactiva 50 µl (50 µl) de muestra control (10 µl de suero y 120 µl de buffer de BED) y se realizará lectura a los 15 min.

3. Se depositó en la tira reactiva 50 µl (50 µl) de muestra control (2.3 µl de suero y 280 µl de buffer de BED) y se realizará lectura a los 15 min.

LIMITANTES

El ensayo Abbott Determine VIH1/2 está diseñado para detectar anticuerpos frente a VIH 1 y 2 en suero, plasma y sangre humanos. Otros fluidos o mezclas de de sueros pueden o no proporcionar resultados exactos.

La intensidad de la barra del paciente no se relaciona necesariamente con el título de anticuerpos con el espécimen.

Un resultado negativo con Determine VIH no excluye la posibilidad de infección con VIH. Puede darse un resultado negativo falso en las circunstancias siguientes:

- Niveles bajos del anticuerpo (por ejemplo especímenes tempranos de seroconversión) que están por debajo del límite de detección del ensayo.
- Infección con una variante del virus que no se detecta fácilmente con la configuración del ensayo Determine VIH.
- Anticuerpos VIH del paciente que no reaccionan con los antígenos específicos utilizados en la configuración del ensayo.
- Manipulación de la muestra tal que resulta en la pérdida de la multivalencia del anticuerpo VIH.

Por estas razones debe tenerse cuidado en la interpretación de resultados negativos. Estos resultados de ensayo se deben considerar en conjunto con otros datos clínicos (ejemplo: síntomas o factores de riesgo).

- Las muestras positivas deben volverse a ensayar usando otro método, y los resultados deben ser evaluados teniendo en cuenta la evaluación clínica completa antes de realizar un diagnóstico.
- Las muestras de plasma o sangre que contiene anticoagulanes que no sean EDTA pueden proporcionar resultados incorrectos.

ANEXO 7. SERODIA HIV

PRUEBA DE AGLUTINACIÓN DE PARTICULAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI VIH-1.

PRINCIPIOS Y VENTAJAS (80)

El componente principal de la prueba SERODIA-HIV es una suspensión de partículas de gelatina, sensibilizadas (recubiertas) con antígeno del virus VIH (*) (Virus de la Inmuodeficiencia Humana), alterado por exposición a un detergente. Como prueba de aglutinación de partículas, éstas se aglutinan en presencia de anticuerpos anti VIH-1 en las muestras de suero o plasma. El antígeno de VIH se prepara a partir de un concentrado del líquido de cultivo de una línea celular productora de VIH-1, mediante centrifugación en gradiente de sacarosa y colección de la fracción vírica a una densidad aproximada de 1,16 g/cm$^{3.}$

SERODIA-HIV tiene las siguientes ventajas:

1. El procedimiento de la prueba es extremadamente simple, utilizando técnicas de microtitulación.
2. Es una prueba rápida cuyos resultados se leen a simple vista, al cabo de dos horas (su aspecto es estable, al menos durante 24 horas).
3. SERODIA HIV utilizan un portador artificial de nuevo desarrollo, las partículas Fuji, que no muestran la aglutinación no específica frecuentemente observada con el uso de portadores eritrocitarios.

COMPONENTES DEL EQUIPO

El equipo SERODIA-HIV consta de los siguientes reactivos y accesorios:

Pruebas	**Solución de reconstitución (líquido)**	**Diluyente del suero (líquido)**	**Partículas sensibilizadas (liofilizadas)**	**Partículas no sensibilizadas (liofilizadas)**	**Control positivo (líquido)**
5 x 20	10 ml 1 vial	20 ml 1 vial	0.6 mL 5 viales**	1.0 mL 5 viales**	0.5 mL 1 vial
4 x 55	20 ml 1 vial	40 ml 1 vial	1.5 ml 4 viales**	2.0 ml 4 viales**	0.5 ml 1 vial

** Después de reconstituir

A. Solución de reconstitución: para utilizarse en la reconstitución de partículas sensibilizadas y partículas no sensibilizadas. Fosfato sódico dibásico, fosfato sódico monobásico, cloruro sódico. Este reactivo contiene un 0.10% (p/v) de acida sódica como conservante.
B. Diluyente del suero: para diluir las muestras de prueba.
Fosfato sódico dibásico, fosfatos potásico monobásico, cloruro sódico. Este reactivo contiene un 0.10% (p/v) de acida sódica como conservante.
C. Partículas sensibilizadas: preparación liofilizada de partículas de gelatina, sensibilizadas con antígeno VIH- inactivado. Para reconstituir, añadir la cantidad indicada de solución de reconstitución. La solución reconstituida contiene un 1% de partículas de gelatina sensibilizadas con antígeno VIH inactivado y ácida sódica al 0.12% como conservante.
D. Partículas no sensibilizadas: preparación liofilizada de partículas de gelatina tratadas con ácido tánico. Añadir la cantidad indicada de solución de reconstitución. El reactivo reconstituido contiene acida sódica 0.12% (p/v) como conservante.
E. Control positivo: suero de conejo inmunizado con antígeno VIH inactivado, preparado para mostrar un título de anticuerpos 1:128, cuando se analiza con el mismo procedimiento que las muestras. Este reactivo contiene un 0.10% (p/v) de acida sódica como conservante.

Accesorios: cuentagotas de 25 µl, aproximadamente (2 pcs). Para utilizar exclusivamente para dispensar las partículas sensibilizada y no sensibilizadas.

PRECAUCIÓN IMPORTANTE: LAS PARTICULAS SENSIBILIZADAS Y DE NO SENSIBILIZADAS DEBEN RECONSTITUIRSE, A TEMPERATURA AMBIENTE (15-30°C), DURANTE AL MENOS 30 MINUTOS ANTES DE LA PRUEBA.

PREPARACIÓN

Preparar el siguiente equipo de laboratorio antes de realizar la prueba:

1. Microplacas en “U”
2. Pipetas
    a. Micropipetas (con puntas desechables)
        -25 µl para dispensar y diluir las muestras
        -50 µl para dispensar las muestras (Procedimiento de absorción)
3. Pipetas volumétricas…1,0 mL y 5,0 mL, para la reconstitución de reactivos.
4. Cuentagotas… de 25 µl, aproximadamente (para añadir las partículas sensibilizadas y no sensibilizadas)
5. Microtitulador – dilutor (opcional)
6. **Bandeja de mezcla (agitador vibrador automático) (opcional)**
7. Bandeja de lectura (opcional)

Si para la dilución de las muestras se utilizan microtituladores-diluidores, en lugar de micropipetas, hay que asegurarse de llevar a cabo el procedimiento especificado en Precauciones en el procedimiento -5.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA:

Preparación de las muestras

Antes de realizar la prueba, para evitar interferencias con los resultados de la misma, hay que eliminar, mediante centrifugación, los eritrocitos u otros componentes visibles presentes en el suero o plasma. No es necesario inactivar la muestra de suero, si bien la inactivación estándar a 56°C durante 30 minutos, no afecta a los resultados.

Realización de la prueba, procedimiento (véase Tabla 1)

1. Utilizando una pipeta cuentagotas calibrada o micropipetas apropiadas, colocar 21 µl (75 µl) del diluyente del suero en el pocillo 1 y 25 µl (25 µl) en los pocillos 2 y 3.
2. Añadir 7 µl (25 µl) de la muestra de suero en el pocillo1, utilizando la micropipeta, y mezclar, llenando y vaciando la pipeta 4 3 o 4 veces. Llenar entonces la micropipeta con 25 µl (25 µl) de la solución diluida del pocillo 1 y transfiéralos al pocillo 2. Mezclar bien y transferir al pocillo 3, siguiendo el mismo procedimiento que en el pocillo 1. Repetir otra vez este procedimiento en el pocillo 3, para obtener unas segunda dilución.
3. Poner una gota 25 µl (25 µl) de partículas no sensibilizadas en el pocillo 2 y 25 µl una gota de partículas sensibilizadas en el pocillo 3, utilizando los cuentagotas incluidos en el equipo.
4. Mezclar bien el contenido de los pocillos, utilizando una bandeja mezcladora o agitándolo vigorosamente. Tapar entonces la placa, colocarla en una superficie horizontal y dejarla a temperatura ambiente 26.7°C (15°-25°C) durante 2 horas (2 horas). Realizar las lecturas al cabo de este tiempo.

TABLA 1. Procedimiento de la prueba

Pocillo No. |	**1**	**2**	**3**
Diluyente de suero (**µl)** Muestra de suero (**µl)**	75 25	25 25	25 25
Dilución de suero	1:4	1:8	1:16
Partículas no sensibilizadas (**µl)**		25	
Partículas sensibilizadas (**µl)**			25
Dilución final		1:16	1:32
Mezclar, tapar la placa e incubar durante 2 horas			
Interpretación			

PRUEBAS DE CONTROL

1. Confirmar que la reacción de cada muestra con las partículas no sensibilizadas es negativa (-) (dilución final de 1:16).
2. En todos los análisis, la mezcla del diluyente del suero con las partículas sensibilizadas y no sensibilizadas debe ser negativa (-) (control del reactivo).
3. Para comprobar la uniformidad de los lotes, confirmar que el título del suero Control Positivo es 1:128 en la dilución final del procedimiento de la prueba. (véase la Tabla 2).

TABLA 2. Procedimiento de la Prueba de Control.

Pocillo No. |	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Diluyente de suero (**µl)** Muestra de suero (**µl)**	75 25	25 25	25 25	25 25	25 25
Dilución de suero	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Partículas no sensibilizadas (**µl)**		25			
Partículas sensibilizadas (**µl)**			25	25	25
Dilución final		1:16	1:32	1:64	1:128
Mezclar, tapar la placa e incubar durante 2 horas					
Interpretación					

INTERPRETACIÓN

Colocar, con cuidado, la microplaca sobre una bandeja de lectura (con iluminación indirecta) o sobre una superficie blanca bien iluminada. Comparar los patrones de aglutinación negativa con los del Control del reactivo e interpretar según los criterios de la Tabla 3.

TABLA 3. Interpretación

Patrones de sedimentación de las partículas	Lectura	Interpretación
Partículas concentradas en forma de botón en el centro del pocillo con un contorno externo redondeado y liso	(-)	Negativa
Partículas concentradas en forma de anillo compacto con un contorno externo redondeado y liso	(±)***	No concluyente
Anillo grande bien definido, con un contorno irregular y aglutinación periférica	(+)	Positiva
Partículas firmemente aglutinadas extendidas, cubriendo uniformemente el fondo del pocillo	(++)	Positiva

*** Las muestras con resultados no concluyentes (±) deben ser analizadas de nuevo según el procedimiento de muestras en la Tabla 1 y los resultados deberán ser interpretados según el criterio de la Tabla 3. La repetición del mismo resultado no concluyente (±) habrá de ser confirmada mediante otros métodos para una final interpretación.

CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN

Una muestra que presenta una reacción negativa con las partículas no sensibilizadas (dilución final del suero 1:16) y aglutinación con las partículas sensibilizadas (dilución final del suero 1:32 o más) se considera como reacción positiva con los criterios de la prueba SERODIA-HIV

PROCEDIMIENTO DE ABSORCIÓN

Si una muestra aglutina con las partículas no sensibilizadas y sensibilizadas, debe ser analizada de nuevo tras el siguiente procedimiento de absorción: No aplico

1. Colocar _____1 gota (25µL) del diluyente de la muestra en el pocillo 3 de la microplaca.
2. Poner _____(350 µL) de partículas no sensibilizadas, reconstituidas, en un tubo de ensayo pequeño.

3. Añadir _____(50 µL) de la muestra al tubo de ensayo, mezclar bien, utilizando un agitador de tubos o mediante vigorosa agitación manual, e incubar, a temperatura ambiente, durante _____20 minutos (mezclar bien, mediante agitación manual, dos veces, durante la incubación).
4. Centrifugar durante _____(5 minutos), a _____(2,000 RPM). Extraer cuidadosamente _____(50 µL) del sobrenadante, colocarlos en el pocillo 2 de la microplaca y mezlcar, llenando y vaciando _____4 veces la pipeta.
5. Transferir_____(25 µL) de la solución diluida desde el pocillo 2 al 3 y mezclar, llenado y vaciando la pipeta _____(4 veces). Repetir este y mezclar, llenando y vaciando la pipeta _____(4 veces). Repetir este procedimiento en el pocillo 3 para obtener la segunda dilución.
6. Proceder con el Procedimiento de la Prueba (descrito previamente), comenzando en el paso 3.

PRECAUCIONES

Precauciones en el procedimiento

1. Mezclar bien el contenido de los pocillos de la microplaca para asegurar unos resultados óptimos.
2. Durante la incubación, tapar la microplaca y preservarla de vibraciones.
3. Hay que tener un cuidado especial si se lava la microplaca para volver a utilizarla, ya que el lavado puede tener un profundo efecto sobre los resultados de la reacción. En la placa no deben quedar residuos de desinfectante o detergente.
4. La seguridad de la calidad del lote al que corresponden los reactivos contenidos en este equipo se basa en el resultado del test obtenido después de la producción de cada lote, utilizando el mismo lote de placa que la proporcionada con el equipo.
5. Si para la dilución de las muestras se utilizan microtituladores. Diluidores en lugar de micropipetas, para obtener buenos resultados es esencial seguir las siguientes instrucciones: calentar la punta de los diluidores, a moderada intensidad, durante 5-10 segundos (entre la parte oxidante y reductora de la llama de un mechero de gas) antes del análisis de cada muestra. Enfriar las puntas, cebarlas (prehumedecer) con salino o agua destilada y secar con papel con papel secante el exceso de líquido. Después de usarlas, calentar la punta de los diluidores en un mechero de gas, dejarlas enfriar y sumergirlas en una solución de glutaraldehido al 2% para su descontaminación y humidificación. Antes de usarlas de nuevo hay que enjuagarlas con agua, calentarlas a la llama, enfriar y cebar con agua destilada o salino.
6. Todos los instrumentos utilizados (pipetas y tubos), soluciones para desechar, puntas, papele, etc, deben manipularse con cuidado porque pueden estar contaminadas con VIH, HB u otros virus. Es necesario descontaminar con solución de glutaraldehido (durante 30-60 minutos al 2.5% durante toda la noche al 1%), autoclave (a 121°C durante 20 minutos o a 115°C durante 30 minutos) o incinerar.
7. En principio, los reactivos liofilizados contenidos en el equipo deben ser utilizados el mismo día de la reconstitución. Sin embargo, guardados a 2°C-10°C, son estables durante 10 días después de la misma.

Precauciones en la manipulación

1. Esta prueba está diseñada para detectar anticuerpos anti-VIH y no detecta el antígeno del virus directamente. Como en cualquier ensayo para la detección de anticuerpos, SERODIA HIV no es capaz de detectar cantidades muy pequeñas de anticuerpos asociadas con una infección temprana o durante la primera fase del periodo de seroconversión. Incluso si las pruebas son negativas, deben utilizarse los síntomas clínicos y otra información en el diagnóstico clínico. Por lo tanto, un resultado positivo o negativo en la prueba no indica un diagnóstico concluyente de infección o inexistencia de infección por el VIH. Una evaluación completa del estado del paciente debe comprender el análisis, cuidadoso de los síntomas clínicos del paciente y la interpretación de los resultados de las pruebas disponibles para la enfermedad.
2. Como ocurre con todas las demás pruebas para la detección de anticuerpos anti VIH-1, en las muestras positivas se debe realizar una prueba confirmadora alternativa, como en el Western Blot, RIP etc. Para el diagnostico de SIDA es necesario evaluar los resultados junto a las pruebas de inmunidad celular y síntomas clínicos.
3. Aunque el antígeno vírico que recubre las partículas es una sustancia no infectiva es de origen biológico y debe tratarse como un agente etiológico.
4. Todos los reactivos contienen acida sódica como conservante. La acida sódica puede formar acidas de cobre o plomo en las tuberías del laboratorio. Dichas acidas son explosivas. Para impedir la acumulación de acidas, irrigue las tuberías con una gran cantidad de gua si se eliminan las soluciones con acidas por el sumidero después de su inactivación.

ANEXO 8. PRUEBA DE BED-CEIA

Prueba SEDIA ™ BED HIV-1 Incidencia EIA

Procedimiento de la prueba. (48)

Utilidad de la prueba

La prueba de inmunoensayo enzimático BED VIH-1 Sedia™ mide la proporción en particular de la IgG específica con la proporción de IgG en las muestras de suero o plasma ~~y~~ determinando el estatus de una infección reciente o de larga duración al referenciar el resultado numérico del inmunoensayo contra la muestra interna de calibrador. El principio de la prueba está basado en la observación de la proporción de IgG específica de VIH contra la proporción de IgG total que será menor en seroconversiones de VIH-1 que en aquellos sujetos con una infección de mayor tiempo. De hecho han sugerido que la IgG específica para VIH puede aumentar de 2 años después de la seroconversión cuando son probados con el inmunoensayo BED.

Principio del procedimiento

1. La prueba de inmunoensayo enzimático BED VIH-1 Sedia™ es una prueba de inmunoensayo de captura de IgG. Durante la incubación de una muestra por 60 min, a 37°C la IgG humana es captada por la IgG de cabra antihumana revestida en los pozos de las microplacas.
2. El péptido de VIH-1 BED biotinizado es incubado por 60 min a 37°C. El péptido es capturado solamente por la IgG anti-HIV.
3. El HRP estreptavidina-marcada es incubada por 90 min a 37°C y se une a la biotina.
4. El sustrato TMB es incubado a 25°C y el color es generado con intensidad proporcional a la cantidad de HRO.
5. La densidad óptica de cada pozo es medida. El valor de la densidad óptica, consistente con la proporción de IgG específica de VIH de la IgG total, es dividida por el valor de la densidad óptica de un calibrador interno del kit para generar la densidad óptica normalizada o "ODn". El valor de la densidad óptica dicta si un resultado necesita ser confirmado y/o la infección de VIH es reciente o de larga duración.

Materiales provistos en el kit y su almacenamiento

Paquete de refrigerador (#3012), deben ser almacenados entre 2 y 8 °C

1. Placas de micro pozos revestidas con inmunoglobulina (IgG) de cabra anti-humana. 2 placas de 96 pozos. Las placas son provistas en bolsas de aluminio con desecante.
2. 10X Wash buffer concentrado. 2 botellas de 100 ml. Contienen buffer de fosfato, detergente y conservador.
3. Diluyente de muestra. 1 botella de 175 ml, contiene buffer fosfato, detergente, agente bloqueador y conservador.
4. TMB sustrato. 1 botella de 27 ml, contiene 3,3´,5,5´tetrametilbenzidina en buffer ácido.
5. Solución Stop. 1 botella de 27 ml, contiene diluyente de solución de ácido.
6. Un inserto y selladores de placas.

Paquete en congelación (#3013): el contenido está a -25°C hasta -10°C.

7. Control negativo 1 vial de 100 µl. Suero humano inactivado no reactivo para HBsAg, anticuerpos de HCV y HIV, contiene conservador.
8. Calibrador 1 vial de 100 µl. Suero humano inactivado reactivo para antígenos de HIV-1. no reactivo para HBsAg, anticuerpos de HCV, contiene conservador.
9. Control positivo bajo. 1 vial de 100 µl. Suero humano inactivado reactivo para antígenos de HIV-1. No reactivo para HBsAg, anticuerpos de HCV, contiene conservador.
10. Control positivo alto. 1 vial de 100 µl. Suero humano inactivado reactivo para antígenos de HIV-1. No reactivo para HBsAg, anticuerpos de HCV, contiene conservador.
11. Peptido BED HIV-1. 1 vial de 50 µl. Péptido de estructura sintética biotinizado que incluye secuencias de gp41 divergente de todos los subtipos de HIV-1 (grupo M) y recombinantes. En buffer BSA con, conservador concentrado al 1001X.
12. Conjugado de estreptavidina-HRP. 1 vial de 50 µl. Estreptavidina conjugada para (HRP) horseradish peroxidasa. Contiene preservativo y está concentrado al 1001X la solución de trabajo conjugada.

Advertencias y precauciones

1. El kit de Sedia™ BED HIV-1 Incidence EIA está destinado únicamente para investigación, específicamente para determinar la incidencia de infección de HIV-1 en ciertas poblaciones. No está destinado para uso en procedimientos diagnósticos o para determinar la evolución clínica o tratamiento.
2. El uso universal de precauciones y buenas prácticas de trabajo en el laboratorio son fuertemente recomendadas. Aunque los controles y calibradores de suero del kit han sido inactivos, estos agentes y cualquier otra muestra clínica deben ser manejados como agentes capaces de transmitir infecciones.
3. Es crítico que se adhiera a todos los rubros del procedimiento, particularmente en tiempos y temperatura. Los componentes no deben ser utilizados posterior a la fecha de caducidad.
4. El kit de Sedia™ BED HIV-1 Incidence EIA está compuesto de dos paquetes, uno para refrigerador y otro para congelador.
5. Para resultados precisos las muestras de sangre seca en papel filtro, suero y plasma deben ser recolectadas solamente en papel filtro aprobado por la FDA, Whatman #903 o Ahlstrom 226.
6. Si el kit de Sedia™ BED HIV-1 Incidence EIA es utilizado para probar muestras de sangre seca en papel filtro, suero o plasma, solamente deben ser utilizados los controles para muestras de sangre seca en papel filtro de Sedia™ para desarrollar la prueba.
7. Desinfecte de manera rápida cualquier derrame utilizando hipoclorito de sodio al 0.5%o su equivalente. Limpie la superficie de trabajo antes y después del procedimiento.
8. Utilice los lavadores de placa, incubadora y lector que se encuentren bajo una instalación adecuada, el desempeño operacional y cualificado deben ser mantenidos adecuadamente para minimizar la variabilidad en la prueba. Es importante leer los resultados en el lector de placas a 450 nm contra una referencia de filtro de 620-650 nm para obtener una densidad óptica precisa y valores de densidad óptica dentro de rangos aceptables.

Notas importantes del procedimiento

1. No utilizar el kit o sus componentes después de la fecha de expiración identificada en el producto o en las etiquetas. Almacene los materiales del kit como se especifica, ya que si no se realza el desempeño de la prueba puede disminuir y puede dar resultados inadecuados.
2. Remueva el paquete del refrigerador y el kit con los controles y calibradores del congelador 60 minutos antes de correr la prueba. Permita que todos los agentes alcancen la temperatura ambiente (15-30°C) antes de usarse. El péptido de BED HIV-1 y la estreptavidina-HRP deben permanecer en el congelador hasta antes de su uso. Coloque la botella de sustrato TMB en la incubadora a 25°C antes de usarse.
3. Si se utilizan menos de 96 pozos, solamente utilice el número requerido de tiras o pozos y regrese los que no se utilicen en la bolsa con desencante, séllelo y resguárdelo entre 2-8°C.
4. Solamente utilice pipetas calibradas. Siempre utilice puntas, tubos y reservorios de los agentes para cada muestra o componente del kit. No intercambie botellas o tapas de viales.

5. Mezcle todos los agentes inmediatamente antes de su uso. Los agentes del paquete del refrigerador pueden ser mezclados gentilmente por inversión de 3-5 ocasiones. Los agentes del paquete de congelación deben ser colocados en el vortex de manera breve. El concentrado de wash buffer típicamente requiere adicionalmente ser mezclado y calentado en agua para disolver los cristales.
6. La preparación de las diluciones 1:101 de las muestras, sueros controles y el kit del calibrador requieren ser mezclados y medidos de manera precisa. De manera cuidadosa mezcle las muestras del diluyente con las muestras, mezclando con la pipeta multicanal con movimiento arriba y abajo en 4 ocasiones como mínimo, pipetee despacio para evitar burbujas. Cambie la punta de la pipeta entre cada muestra. Se recomienda trabajar con muestras con filtro para evitar contaminación cruzada. Las puntas sin filtro pueden ser utilizadas para todos los siguientes pasos.
7. El kit y los componentes deben ser regresados al almacenaje recomendado posterior a su uso.

Materiales requeridos que no son provistos en el kit

- Tubos de polipropileno de 1.2 mL para microdilución en un rack de 8x12.
- Tubos con tapa de propileno de 12-15 mL
- Cilindros graduados, matraces
- Pipetas serológicas con bulbo o su equivalente
- Pipetas de un canal de (2-100 µl) y pipetas multicanal de (100-200 µl). Se recomienda utilizar puntas con filtro evitar contaminación cruzada en el manejo de las muestras. Jeringas de repetición o multi pipetas con puntas y se recomienda remplazarlas para la medición del concentrado de conjugado SA-HRP.
- Reservorios para cada agente
- Incubadoras, una a temperatura de 37°C (±2 °C) y 25°C (±2 °C).
- Mezclador en vortex
- Lavador de placas
- Espectrofotómetro capaz de leer 96 pozos a 450 nm con un filtro de referencia de 620-650 nm.
- Reloj
- Agua desionizada
- Cloro de uso doméstico (5-8% de hipoclorito)
- Equipo de protección del personal (guantes desechables, glases de seguridad, etc),
- Contenedor de desecho de riesgo biológico.

Preparación de los reactivos

1. Saque el paquete del refrigerador y el kit de los controles y el calibrador del paquete en congelación 60 minutos antes de que se corra la prueba. Permita que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (15-30°C) antes de ser utilizados excepto para el punto señalado abajo.
2. El péptido de HIV-1 BED y los reactivos de estreptavidina-HRP deben permanecer en congelación previo a su uso inmediato. Coloque la botella de sustrato TMB en una incubadora a 25°C hasta su uso. Regrese todos los componentes del kit a sus

condiciones recomendadas de almacenamiento inmediatamente posterior a ser utilizados.

3. Prepare el 1X Wash Buffer como se indica:
    a. Mezcle 100 mL de 10X Wash buffer concentrado y 900 mL de agua desionizada.
    b. Mezcle bien utilizando un agitador magnético y revolver la placa al menos por 10 minutos.
    NOTA: El concentrado de Wash Buffer 10X probablemente requiera calentarse brevemente en baño maria para disolver los cristales que tenga remanentes.
4. El péptido de VIH-1 BED y el conjugado de estreptavidina-HRP probablemente necesiten ser centrifugados de manera breve, después de ser colocados en el vortex ya que suelen concentrarse en la tapa después de ser colocados en el vortex.

Procedimiento de la prueba

1. Creación del diagrama o mapa de la placa. Se preparan los controles negativos por duplicado, los otros dos controles y el calibrador son probados por triplicado, durante el inicio de la prueba todos los especímenes son probados por separados.
2. La elución y preparación de los especímenes secos y controles puede realizarse utilizando uno de los métodos: 1) pre-placa no tratada de ELISA 2) tubos titulados.
3. Preparación y adición del suero líquido o plasma de especímenes. El suero liquido o los especímenes de plasma deben ser diluidos 1:101 en 1.2 mL microtubos de dilución de propileno en un estante de 8x12.
    a. Se utiliza una pipeta monocanal para transferir 500 µL (500 µl) del diluyente de la muestra en cada tubo titulado.
    b. Usar una micropipeta para transferir 5 µl (5 µl) de cada control, calibrador y de las muestra en cada tubo titulado, con 500 µL del diluente de la muestra.
    c. Se preparan por separado 2 diluciones de los controles negativos.
    d. Se preparan por separado 3 diluciones del calibrador.
    e. Se preparan por separado 3 diluciones del control positivo bajo.
    f. Se preparan por separado 3 diluciones del control positivo alto.
    g. Se prepara una dilución para que cada espécimen sea probado.
    h. Con precaución se debe mezclar los controles y especímenes en los tubos de la placa, removiendo de manera gentil y sacado el fluido en una pipeta monocanal de 5 (4-6 veces).
    i. Posterior a mezclar, se usa una pipeta multicanal para transferir 100 µL (100 µL) de cada espécimen o control del tubo del tubo titulado a los pozos de la placa BED.
4. Procedimiento de la prueba
    a. Aplicar un sellado de placa a la placa e incube por 1 hora (1 hora) a 36.3 °C 37°C (±2°C).
    b. Saque el péptido BED HIV-1 concentrado de congelamiento –20°C.
    c. Coloque el vial en el vortex brevemente y transfiera 10 µL (12 µL) del péptido concentrado BED en un tubo que contenga 10 ml (12 ml) del diluyente de la muestra para preparar una dilución de 1:1001 1:1001.
    d. Tape y coloque el tubo en el vórtex.
    e. Transfiera el péptido BED diluido en un reactivo de depósito.
    f. Después de 1 hora (1 hora) de incubación de la muestra, lave el plato 4 veces (4 veces) con 1X Buffer Wash, utilizando un lavador. Prepare el lavador para

dispensar 300 µL (300 µL) por ciclo y remojando por 10 segundos. Después de que se completó el lavado, se remueve cualquier residuo del buffer.

g. Transfiera 100 µL (100 µL) por pozo del péptido diluido BED del depósito a la placa de la prueba BED lavado utilizando una pipeta multicanal.
h. Aplique un sellador de placa a la placa con el péptido BED e incube por 1 hora (1 hora) a 36.3 °C (37°C) (±2°C).
i. Retire el conjugado concentrado de Estrepatavidin-HRP (SA-HRP) de congelamiento –20°C.
j. Para preparar la solución del conjugado, coloque brevemente el vial en el vórtex y transfiera10 µL (12 µL) de la (SA-HRP) en un tubo que contenga 10 ml (12 µL) de la muestra del diluyente para preparar una dilución de 1:1001 (1:1001). Haga la transferencia con la pipeta de manera lenta para asegurarse que se transfiera el volumen correcto.
k. Tape el tubo y colóquelo en el vortex o mezcle de manera gentil invirtiendo el tubo de 7 veces (6-8 veces).
l. Transfiera la solución del conjugado en un depósito con reactivo.
m. Después de 1 hora (1 hora) de incubación con el péptido BED lave el plato 4 veces (4 veces) con 1X Buffer Wash, utilizando un lavador. Prepare el lavador para dispensar 300 µL (300 µL) por ciclo y remojando por 10 seg (10 segundos). Después de que se completó el lavado, se remueve cualquier residuo del buffer.
n. Transfiera 100 µL (100 µL) por pozo de la solución de conjugado Estrepatavidin-HRP (SA-HRP) del depósito a la placa lavada, utilizando una pipeta multicanal.
o. Aplique un sellador de placa a la placa con la solución del conjugado e incube por 1.5 horas (1.5 horas) a 36.3 °C (37°C) (±2°C).
p. Después de la incubación, lave el plato 4 veces (4 veces) con 1X Buffer Wash, utilizando un lavador. Prepare el lavador para dispensar 300 µL (300 µL) por ciclo y remojando por 10 seg (10 segundos). Después de que se completó el lavado, se remueve cualquier residuo del buffer.
q. Se saca el sustrato TMB del incubador de 25.7°C (25°C) y se transfiere a un depósito con reactivo. Se utiliza una pipeta multicanal para transferir 100 µL (100 µL) del sustrato TMB a cada pozo.
r. Se incuba el plato con sustrato TMB por 15 minutos (15 minutos) exactos a 25.8°C (25°C) (±2°C). La placa no se debe cubrir con sellador de placa, únicamente con una cubierta que no permite el paso de la luz, esta puede ser de aluminio.
s. Posterior a los 15 minutos (15 minutos) de la incubación del sustrato TMB, la reacción se para añadiendo 100 µL (100 µL) de solución de paro en cada pozo utilizando una pipeta multicanal. No se debe lavar la placa antes de añadir la solución de paro.
t. Inmediatamente después de la adición de la solución de paro, se utiliza un espectrofotómetro para leer las placas con una longitud de onda de 450 nm (450 nm), utilizando como referencia un filtro con longitud de onda de 620 nm (620-650 nm).

5. Se realizan la validación y cálculo de los resultados:
   a. Se calcula la mediana por espectrofotometría para cada control y calibrador.
   b. Se determina si los valores de la mediana caen en un rango aceptable especificado para cada control y calibrador.
   c. Se determinan los resultados normalizados para cada control, calibrador y cada espécimen.

Cálculo y Validación de Resultados

1. Calcule la mediana de la densidad óptica de cada control y del calibrador. La mediana del valor de las 3 densidades ópticas será el valor medio.
2. Determine si la **densidad óptica de la mediana** cae dentro del rango aceptable especificado para cada control y calibrador.

	NC	CAL	LPC	HPC
Minimum	0.000	0.380	0.200	0.600
Maximum	0.250	1.350	0.800	2.100

Si la mediana del valor de la densidad óptica de cualquiera de los controles y calibradores no está dentro de los rangos de arriba, la corrida es inválida y debe repetirse con diluciones frescas de las muestras.

3. Determine los resultados de la densidad óptica normalizada para cada control, calibrador y muestra. La densidad óptica normalizada se calcula al dividir del valor de la densidad óptica entre la mediana de la densidad óptica del calibrador.

$$ODn = \frac{\text{(OD de la muestra, control o calibrador)}}{\text{Densidad óptica del calibrador}}$$

4. Determine la si el valor de la densidad óptica normalizada para cada control y calibrador cae dentro del rango aceptable listado abajo. Si la densidad óptica normalizada de cualquiera de los controles cae fuera del rango, la corrida es inválida y debe repetirse con diluciones frescas de las muestras.

	NC	CAL	LPC	HPC
Minimum	0.000	1.000	0.400	1.200
Maximum	0.300	1.000	0.750	1.900

Interpretación de los resultados de la prueba

Durante el modo de cribado, el valor de la densidad óptica normalizada dictado si la muestra es considerada de larga duración o si debe ser sujeto para prueba confirmatoria. Especialmente si la densidad óptica normalizada de una muestra es >1.2 durante el modo de cribado, no se requieren más pruebas y la muestra es considerada infección de larga duración. Si la **densidad óptica normalizada es ≤1.2 durante** el modo de cribado, entonces la prueba debe ser sujeta a una prueba confirmatoria.

Durante el modo de confirmación. Si la densidad óptica normalizada de una muestra es ≤ 0.8, entonces la muestra debe ser considerada de seroconversión reciente. **Si la densidad óptica es >0.8 entonces la muestra debe ser considerada infección de larga duración.**

Prueba confirmatoria

Si la ***densidad óptica normalizada es ≤1.2 durante el modo de cribado, entonces la prueba debe ser sujeta a una prueba confirmatoria.***

ANEXO 9. PRUEBA DE LAg-Avidity.

PRUEBA DE LAg-Avidity

Principio de la prueba [39]

Se basa en la maduración de los anticuerpos de VIH que se incrementa en avidez, en el transcurso de una infección. Cuando existe una infección reciente los anticuerpos tendrán baja avidez, mientras que en la infección crónica o de larga duración los anticuerpos posees una avidez alta.

Materiales requeridos

- Tubos para las diluciones de las muestras: tubos aforados de 1.2 mL y compatibles para pipeta multicanal.
- Pipetas multicanal y puntas con capacidad de dispensar de 2-20 µl y de 10-100 µl.
- Incubadoras de 37°C (± 1°C) y de 25 °C (± 1°C)
- Vortex
- Lavador de placas para 96 pozos
- Espectrofotómetro con capacidad de lectura para 96 pozos a 450 nm con un filtro de referencia de 630-650 nm.
- Placa de agitación
- Tubos de centrifugación de propileno de 15 mL
- Cronómetro
- Agua desionizada
- Papel absorbente
- Hipoclorito (5-8%)
- Guantes desechables
- Pipetas serológicas

- 60 minutos antes de la prueba, saque los reactivos de refrigeración y de congelamiento. Permitan que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (15-30°C) antes de ser utilizados, **excepto el conjugado** que debe ser mantenido en el refrigerador 10 min antes de su uso. Regrese a refrigeración

Elusión de muestra en papel filtro:

- Colocar con una pinza __1___ (1 sólo circulo de c/u de las muestras) a cada pozo de la placa según corresponda.
- Agregar _500 µL_ (500 µL) de diluyente de muestra a todos y cada uno de los pozos de la placa según corresponda. Mientras se añade el diluyente, de manera cuidadosa mezcle 3 veces la solución, evita la formación de burbujas.
- Cubrir la placa con el sello adhesivo e incubar de 2-8°C por 12-16 hrs, para su elusión:
    - Hora de inicio de incubación de elución: 16:40__ Tem refri:__4.0°C_ Tem Ambiental:__27.6°C__
    - Hora de finalización de incubación de elución:_07:45__ Tem refri:__4.0°C_ Tem Ambiental:_27.1°C_.

Preparación de los reactivos

1. Remueva el kit del refrigerador y del congelador. El conjugado concentrado debe permanecer el refrigerador hasta 10 minutos antes de utilizarse. Permita que el resto de los reactivos alcancen la temperatura ambiente (15-30°C) antes de ser utilizados.
2. Placa de micropozos: remueva la placa de su bolsa de papel aluminio. Remueva las tiras de la placa que no serán utilizadas y regréselas a la bolsa de papel aluminio a una temperatura de entre 2-8°C.
3. Prepare el 10X Wash Buffer concentrado como sigue:
    a. Mezcle _100 mL_ (100 mL) de 10X Buffer de lavado concentrado y _900 mL (900 mL) de agua desionizada.
    b. Mezcle adecuadamente utilizando una barra de agitación magnética por un mínimo de 10 minutos 10 minutos). Nota: el buffer de lavado 1X debe ser guardado a temperatura ambiente 20-26°C (15-30°C) para su uso dentro de 2 semanas después de lo cual debe desecharse.
4. Solución de conjugado: debe ser preparado cada vez que se desarrolle la prueba, se debe diluir Conjugado concentrado (200X) con el diluyente de conjugado. Saque el conjugado concentrado del refrigerador y permita que se deshiele antes de ser utilizado. Para correr una placa con 96 pozos, diluya 60 µl (60 µl) de conjugado concentrado en 12 mL (12 mL) de diluyente de conjugado. Mezcle la solución preparada de conjugado por inversión de manera gentil entre ___5___(3 y 5 veces).

Procedimiento de la prueba.

1. Creación del diagrama o mapa de la placa. Se preparan los controles negativos por duplicado, los otros dos controles y el calibrador son probados por triplicado, durante el inicio de la prueba todos los especímenes son probados por separados.
2. Procedimiento de la prueba. El suero liquido o los especímenes de plasma deben ser diluidos _1:101 1:101 en __-___(1.2 mL) microtubos de dilución de propileno en un estante de 8x12 con el mapa de la placa.
    a. Se utiliza una pipeta multicanal para transferir __-___(500 µL) del diluyente de la muestra en cada tubo titulado.
    b. Usar una pipeta para transferir _5 µl (5 µl) de cada control, calibrador y de las muestra en cada tubo titulado, con __500 µL (500 µL) del diluente de la muestra. Utilice una nueva pipeta para cada control, calibrador o muestra para evitar

contaminación. La adición en las muestras debe ser consistente con el mapa la de placa.

c. Se preparan por separado 2 diluciones de los controles negativos.
d. Se preparan por separado 3 diluciones del calibrador.
e. Se preparan por separado 3 diluciones del control positivo bajo.
f. Se preparan por separado 3 diluciones del control positivo alto.
g. Se prepara una dilución para cada que cada espécimen sea probado.
h. Con precaución se debe mezclar los controles y especímenes en los tubos de la placa, removiendo de manera gentil y sacando el fluido en una pipeta multicanal de 5 (4-6 veces). Al realizar este procedimiento despacio se evita la formación de burbujas. Cambie la punta de la pipeta para cada muestra.
i. Posterior a mezclar, se usa una pipeta multicanal para transferir 100 µL (100 µL) de cada espécimen o control del tubo del tubo titulado a los pozos de la placa. Use una nueva punta de pipeta para cada muestra o control.
j. Aplica un sellador de placa en la placa e incube 1 hr (1 hora) a 37°C (±1°C).
   Hora de inicio: 09:09 Hora de finalización 10:10
   Temp inicial: 36.3 °C Temo final: 36.4°C
k. Después de 1 hora de incubación de la muestra, lave el plato 4 veces con 1X Buffer Wash, utilizando un lavador. Prepare el lavador para dispensar 300 µL (300 µL) por ciclo, remojando o empaparlo por 10 segundos entre lavados. Programa No. 96 Después de que se completó el lavado, se remueve cualquier residuo del buffer en los pozos envolviendo el papel en papel absorbente y volteándolo gentilmente.
   Utilizando una pipeta multicanal añada 100 µL (100 µL) de buffer de disociación en cada pozo, cubra la placa con un sellador de placa e incube exactamente por 15 min (15 minutos) a 37°C (±1°C).
   Hora de inicio: 10:21 Hora de finalización 10:36
   Temp inicial: 36.3°C Temp final: 36.2°C
l. Saque el conjugado del refrigerador y permite que se deshiele completamente, diluya el conjugado anti-humano de cabra 1:200 en diluyente de conjugado para la placa como sigue:
   i. Para la placa completa: pase por el vortex el conjugado de cabra antihumano y añada de 60 µl a 12 µl del conjugado de diluyente, colóquelo en el vortex para que se mezcle adecuadamente. Regrese el conjugado al refrigerador.
   ii. Para uso parcial de la placa: para una tira de 8, utilice 5 µl de conjugado anti-humano de cabra en 1 mL de diluyente de conjugado. Regrese el conjugado al refrigerador en cuanto deje de utilizarlo.
m. Después de los 15 min de incubación de la muestra, lave el plato 4 veces con 1X Buffer Wash, utilizando un lavador. Prepare el lavador para dispensar 300 µL (300 µL) por ciclo, remojando o empaparlo por 10 segundos entre lavados. Programa No. 96 Después de que se completó el lavado, se remueve cualquier residuo del buffer en los pozos envolviendo el papel en papel absorbente y volteándolo gentilmente.
   Utilizando una pipeta multicanal, transfiera 100 µL (100 µL) a cada pozo de la solución del conjugado, cubra la placa con un sellador de placa e incube por 30 min (30 min) a 37°C (37°C) (±1°C).
   Hora de inicio: 10:48 Hora de finalización 11:18
   Temp inicial: 36.2°C Temp final: 36.3°C
n. Realice lavado de la placa como en los pasos previos (k y n).

o. Utilizando una pipeta multicanal transfiera 100 µL de sustrato TMB en cada pozo. (no cubra la placa).
Incube la placa con TMB exactamente por 15 min (15 minutos) a (25°C) (±1°C) para desarrollo del color. **La placa no debe cubrirse con sellador.**
Hora de inicio: 11:30 Hora de finalización 11:46
Temp inicial: 24.5°C Temp final: 24.5°C

p. Posterior a los 15 minutos de la incubación del sustrato TMB, pare la reacción añadiendo _____ (100 µL) de solución de paro en cada pozo utilizando una pipeta multicanal. No se debe lavar la placa antes de añadir la solución de paro.
Hora de adición de solución de paro: 11:48

q. Inmediatamente después de la adición de la solución de paro, se utiliza un espectrofotómetro para leer las placas con una longitud de onda de 450 nm 450 nm, utilizando como referencia un filtro con longitud de onda de 620 630 a 650 nm. Hora de lectura: 11:54

Validación y cálculo de resultados.

Determine la densidad óptica de la mediana para cada control y calibrador. El valor de la densidad óptica de la mediana es el valor de en medio de las 3 densidades ópticas. La mediana de los calibradores es utilizado para calcular la densidad óptica normalizada. Los valores de las medianas son utilizados en las muestras cuando la prueba confirmatoria está completa. La mediana de la densidad óptica de cada control y calibrador deben estar dentro de los rangos aceptables especificado para cada control y calibrador.

Rangos de la OD de la mediana de controles y calibradores

Si la OD de la mediana de los calibradores o controles cae fuera de los límites de estos rangos, la prueba es inválida, debe ser rechazada y repetida. Para el control negativo, ambos valores individuales de la OD deben encontrarse dentro del rango para calibradores negativos en los resultados iniciales y confirmatorios.

	OD Aceptables			
	NC	**CAL**	**LPC**	**HPC**
Mínimo	0.000	0.400	0.180	1.000
Máximo	0.080	0.995	0.470	2.000

Calculo de los resultados de la OD normalizada

La densidad óptica normalizada disminuye la variabilidad en cada corrida e incrementa la reproducibilidad. Determina la OD normalizada para la mediana de las OD observadas de cada valor para cada control. La densidad óptica normalizada se calcula al dividir la densidad óptica de la mediana para cada control, entre la OD de la mediana del calibrador.

La densidad óptica normalizada de los controles o calibradores= (la densidad óptica de la mediana de los controles y los calibradores) dividida entre (OD de la mediana del calibrador).

$$ODn = \frac{\text{(ODs de los controles o calibrador)}}{\text{OD de la mediana del calibrador}}$$

La densidad óptica normalizada de las muestras se determina de la siguiente manera:

$$ODn = \frac{\text{(OD de la muestra)}}{\text{OD de la mediana del calibrador}}$$

Para la prueba confirmatoria la ODn es la mediana del triplicado de los valores de las OD para cada muestra entre la mediana de la OD del calibrador.

Determine si el valor de la ODn para cada control y calibrador cae dentro del rango aceptable listado aquí abajo. Si la ODn de cada control cae fuera del rango, la prueba es inválida y debe ser repetida utilizando muestras frescas diluidas.

	OD Aceptables			
	NC	**CAL**	**LPC**	**HPC**
Minimun	0.000	1.000	0.320	1.500
Maximun	0.100	1.000	0.650	2.600

Interpretación de los resultados.

Todas las pruebas serán corridas de primera vez con el Kit. Las muestras con una ODn inicial >2.0 son consideradas como seroconversores de larga duración, pero si la ODn es ≤2.0 las muestras serán probadas de nuevo por triplicado para confirmar los valores de la ODn. En la prueba confirmatoria si el valor es ≤ 1.5 la muestra será considerada infección reciente.

Las pruebas serán medidas por espectrofotometría, las que obtengan un resultado ≤ 2.0, tendrá que ser repetida por triplicado para confirmación y si el resultado es ≤ 1.5 será diagnosticado como positiva para infección reciente.