

## Evaluación de un kit de 4ª generación para detección simultánea de Antígeno y Anticuerpo contra el HIV

Torruella, M.; Zelus, D. - Centro de Investigación y Biotecnología Wiener Laboratorios S.A.I.C. - Rosario - Argentina

### Introducción

La evidencia serológica de la infección por HIV-1 y HIV-2 puede ser obtenida determinando la presencia de antígenos y anticuerpos en el suero de individuos en los que se sospecha que tienen la infección. Los antígenos pueden generalmente ser detectados en la fase aguda y durante la fase sintomática de la enfermedad. Los anticuerpos pueden ser detectados a lo largo de toda la infección, comenzando en la fase aguda o inmediatamente después de ella. Por ello es de fundamental importancia la utilización de una determinación de alta sensibilidad que pueda detectar antígenos y anticuerpos. El ensayo de HIV Ag/Ac ELISA 4ª Generación de Wiener lab. está diseñado para detectar antígeno p24 así como anticuerpos contra HIV-1, HIV-1 grupo O y HIV-2.

### Materiales

Producto en ensayo: HIV Ag/Ac ELISA 4ª Generación  
Se trata de un método inmunoenzimá-

tico en el cual los pocillos de la policubeta están recubiertos con proteínas recombinantes y péptidos sintéticos de HIV-1 y HIV-2 y anticuerpos monoclonales anti-p24. La muestra se incuba en los pocillos y si la misma contiene p24 y/o anticuerpos contra HIV-1 o HIV-2 se unirán a los antígenos y/o anticuerpos del pocillo. El material no unido se remueve por lavado. En el paso siguiente se agrega el Conjugado 1 que contiene anticuerpos y antígenos marcados con biotina que se unirán a los antígenos/anticuerpos si están presentes en la muestra. Luego se agrega el Conjugado 2 (peroxidasa conjugada a estreptavidina) que se unirá al Conjugado 1. El conjugado no unido se remueve por lavado.

A continuación se agrega una solución conteniendo tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno. Las muestras reactivas desarrollan color azul que vira al amarillo cuando la reacción se detiene con ácido sulfúrico (Stopper).

### Instrumental utilizado

Para realizar los ensayos se utilizaron el lector y el lavador Stat Fax (Awareness Technology).

El presente estudio tuvo por objetivo la evaluación de desempeño de un kit ELISA de 4ª generación Wiener lab. para la detección simultánea de antígeno p24 y anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) por medio de la estimación de la sensibilidad y especificidad clínicas y precisión del método.

A continuación se muestran los resultados obtenidos

### Determinación de Sensibilidad

#### Sensibilidad Clínica

Para determinar la sensibilidad clínica se realizaron estudios sobre distintos paneles:

a) *Sensibilidad clínica con Paneles de seroconversión comerciales (BBI, Boston Biomedica, Inc).*

Los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla I.

b) *Sensibilidad clínica en Paneles de Performance de BBI.*

En un estudio realizado sobre diferentes paneles comerciales internacionales, se obtuvieron los siguientes resultados: PRZ204 (HIV 1/2 Combo Performance Panel): se detectaron 14 de 14 muestras reactivas.

PRZ205 (HIV 1/2 Combo Performance Panel): se detectaron 14 de 14 muestras reactivas.

PRB204 (Anti-HIV 1 Mixed Titer Performance Panel): se detectaron 23 de las 23 muestras reactivas.

PRB108 (Anti-HIV 1 Low Titer Performance Panel): se detectaron 14 de 14 muestras reactivas.

Tabla I

Paneles BBI		Resultados HIV Ag/Ac ELISA 4ª Generación	Resultados Western Blot (según BBI)
Nombre del panel	Días de recolección de las muestras	Tiempo (días) en que la muestra se vuelve reactiva	
Panel BBI 916 P	0 4 9 15 30 35	15	30
Panel BBI 924 X	0 2 8 10 26 33 35 40	26	35 (indeterminada)
Panel BBI 925 Y	0 10 18 22 44 49	44	44 (indeterminada)
Panel BBI 926 Z	0 2 7 9 27 32	7	27
Panel BBI 927 AB	0 28 33 35 40	28	35
Panel BBI 929 AD	0 4 14 18 21 25 28	18	25-28
Panel BBI 931 AF	0 2 7 9 15 28 33 35 42	28	33
Panel BBI 935 AJ	0 10 16 21 24 28 43	28	43
Panel BBI 944 AT	0 2 7 9 14 16	7	14 (indeterminada)
Panel BBI 945 AU	0 3 7 13 15 20	13	20
Panel BBI 946 AV	0 4 7 11	7	ND
Panel BBI 948 AX	0 18 20 23	23	No reactivo
Panel BBI 954 BD	0 2 7 10 14 17 21	21	No reactivo
Panel BBI 955 BE	0 3 7 12 14	7	todas las muestras indeterminadas
Panel BBI 956 BF	0 40 42 47 50	47	No reactivo
Panel BBI 957 BG	0 7 9 14 16 23 28	23	todas las muestras indeterminadas
Panel BBI 958 BH	0 2 7 9 15 17	9	No reactivo
Panel BBI 959 BI	0 7 9 14 19 21 26	7	14

ND: no determinada

c) *Sensibilidad clínica en Paneles de muestras reactivas anti-HIV.*

En un estudio realizado sobre 540 muestras de pacientes con infección por HIV-1 y HIV-2 confirmadas por diferentes métodos, se encontraron reactivas la totalidad de las muestras con el kit HIV Ag/Ac ELISA 4ª Generación.

Nº de muestras	Sensibilidad
361 [hospitales]	100%
203 [población de riesgo]	100%
153 muestras reactivas y 50 no reactivas	
26 muestras HIV-2	100%

### Sensibilidad antígeno p24

El panel BBI PRA801 (HIV Antigen Sensitivity Panel) consiste en diluciones seriadas de cultivo de células infectadas por HIV-1. La concentración de antígeno p24 se determina con los estándares: WHO: HIV-1 p24 Antigen 90/636, DuPont HIV p24 y Sanofi HIV Antigen, detectán-

dose hasta la dilución número 9 (concentración de p24 < 2 pg/ml, según BBI) con el kit HIV Ag/Ac ELISA 4ª Generación.

### Ensayos de Especificidad

#### Especificidad Clínica

En un estudio realizado sobre 3250 muestras de sueros y plasmas provenientes de dos centros diferentes, ensayadas por el kit HIV Ag/Ac ELISA 4ª Generación, se encontraron 99,94% (3229/3231) de muestras no reactivas. De las 21 muestras inicialmente reactivas, 19 fueron reactivas, confirmadas por otros métodos.

Tabla II

	Promedio DO/CO	Intra-ensayo C.V.	Inter-ensayo C.V.	Inter-lote C.V.
Muestra 1	2,44	9,19 %	10,88 %	13,44 %
Muestra 2	1,5	10,24 %	13,2 %	12,67 %
Control positivo	15,09	2,12 %	2,13 %	2,52 %
Control negativo	0,074	14,68 %	13,58 %	23,42 %

n = 144

### Especificidad

En un estudio realizado sobre 561 muestras provenientes de una población de edad avanzada ensayadas por el kit HIV Ag/Ac ELISA 4ª Generación, se encontró una especificidad de 99,82%. Se estudió la posible aparición de reacciones cruzadas ensayando muestras provenientes de 266 individuos con diferentes condiciones clínicas que pueden ser causantes de reacciones inespecíficas para el ensayo HIV Ag/Ac ELISA 4ª Generación. Estas condiciones incluyen: mujeres embarazadas y pacientes hemodializados, con enfermedades autoinmunes o enfermedades infecciosas diferentes a HIV (sífilis, HTLV, Hepatitis B, Hepatitis C, CMV, adenovirus, otras). Solamente, una muestra perteneciente al grupo de enfermedades autoinmunes presentó una reactividad no específica. Para esta población la especificidad es de 99,62%.

### Precisión

Se realiza un estudio de reproducibilidad intra e inter-ensayo, así como también inter-lote, con muestras de diferentes niveles de reactividad (Tabla II).

### Bibliografía

- Center for Disease Control and prevention. Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Antibody testing (2001).
- Weber, B. et al. - J. Clin. Microbiol. 36/8:2235 (1998).
- Saville RD, et al. - J. Clin. Microbiol. 39/7:2518 (2001).
- Roques P, et al. - Virology 302/2:259 (2002).
- Yilmaz G. - J. Clin. Virol. 21/3:187 (2001).



# Síndrome Urémico Hemolítico

El presente artículo representa un extracto de la monografía realizada por el Dr. Gastón E. Carri Saraví, Policlinico Regional Avellaneda de Buenos Aires. Para obtener el trabajo completo, dirigirse al departamento de Marketing de Wiener Laboratorios.

[marketing@wiener-lab.com.ar](mailto:marketing@wiener-lab.com.ar)

**E**l Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por la asociación de anemia hemolítica microangiopática, insuficiencia renal aguda (IRA), trombocitopenia y evidencias de coagulación intravascular. Se presentan signos de agresión multiparenquimatosa del riñón, encéfalo y tubo digestivo, más una relativa hipertensión arterial. La diarrea y las infecciones respiratorias altas son los principales factores que alertan sobre la posible presencia de esta entidad. Es la causa más frecuente de IRA en pediatría. Afecta fundamentalmente a niños desde el segundo semestre al tercer año de vida, eutróficos y de buenas condiciones sociales. No se pueden excluir aunque su prevalencia sea muy inferior a la observada en este grupo a los niños más pequeños y adolescentes. Afecta por igual a ambos sexos y se presenta todo el año con mayor incidencia en verano y primavera. Suele presentarse en brotes epidémicos reportándose la mayoría de los casos en guarderías, parques acuáticos y restaurantes de comidas rápidas debido a la mala cocción de la carne de las hamburguesas.

## Causas

El SUH tiene muchas causas conocidas y algunas desconocidas. Variadas manifestaciones de disfunción renal que van desde una simple alteración del sedimento urinario hasta cuadros muy severos de anuria por necrosis cortical renal total o parcial. Manifestaciones neurológicas de importancia son simultáneas, posteriores a las renales, o ausentes por completo dentro del cuadro clínico. Por lo tanto debido a las diferentes intensidades según el agente causal o patología de base a la que se asocia, es

necesario distinguir las distintas variantes o formas clínicas de este síndrome. Principalmente se presenta como consecuencia de infecciones por E. coli, Shigella sp. y Neumococo. También se lo asocia a diversas drogas: anticonceptivos orales, agentes quimioterápicos (principalmente Mitomicina C); luego de transplantes y a procesos malignos de próstata, gástricos y pancreáticos.

## Clasificación

En el cuadro I se describen las distintas formas de la enfermedad.

De todas estas formas de SUH, debe enfatizarse que la asociada a infecciones por E. coli entero hemorrágica, productoras de toxinas tipo Shiga (también conocidas como verotoxinas) es la más frecuente, mejor conocida en cuanto a su fisiopatogenia, se da principalmente en niños y es endémica en nuestro país. Teniendo en cuenta lo anterior, considerando las evidencias clínicas, epidemiológicas y estudios microbiológicos que

remarcan una etiología infecciosa predominante, y recalando que más del 90% de los niños con SUH asociado a un cuadro diarreico evidencian las toxinas producidas por la E. coli de serotipo más frecuente O157:H7; puede clasificarse al SUH como: SUH típico al que presente antecedentes de diarrea (D+), y SUH atípico al que no presente antecedentes de diarrea (D-).

Ante un cuadro agudo, compatible con SUH, puede clasificarse como confirmado, probable o posible, con la clínica, datos de laboratorio y antecedentes previos del paciente. Se toma esta clasificación como punto de partida y diagnóstico presuntivo, para futuros estudios de certeza confirmatoria y diagnóstico definitivo.

## A- Confirmado:

Cuadro clínico y datos de laboratorio que evidencien:

- Anemia (de inicio agudo) con cambios microangiopáticos (esquistocitos, burr cells or helmet cells) en sangre periférica.
- Daño renal (de inicio agudo) evidenciado por hematuria, proteinuria y/o creatinina elevada (> 1,0 mg/dl en niños < 13 años, o > 1,5 mg/dl en niños > 13 años; o > 50% elevada por sobre la línea de base).
- Las plaquetas pueden detectarse disminuidas en el inicio de la enfermedad, pero pueden normalizarse o incluso aumentar posteriormente.

## Cuadro I

I. Idiopática	Formas atípicas, esporádicas o recurrentes, con mayor incidencia en niños mayores y jóvenes.
II. Asociadas o secundarias	1- Infecciones: a- E.coli (serotipos O157-H7, O216, O111, O121, etc.). Shigella dysenteriae (serotipo 1). (Productores de SHIGA toxina, tipo 1, 2, 2c y 2e) b- Otras bacterias (neumococos, meningococos, salmonellas, etc.) c- Rickettsias d- Virus (EBV, coxsackie, parvovirus, HIV, etc) e- Hongos f- Vacunas (sarampión, parotiditis, tétanos, etc) 2- Drogas 3- Neoplasias. Quimioterapia 4- Embarazo y parto 5- Enfermedades autoinmunes 6- Transplante de órganos 7- Otras nefropatías, picadura de víbora, etc
III. Formas familiares	a- Autosómica recesiva b- Autosómica dominante c- Déficit de complemento (Factor H)

## B- Probable:

- Paciente con cuadro agudo diagnosticado como SUH o PTT (púrpura trombótica trombocitopénica) que reúne los criterios de laboratorio pero sin antecedentes de diarrea sanguinolenta aguda en las últimas tres semanas.
- Paciente con cuadro agudo diagnosticado como SUH o PTT con diarrea aguda de inicio dentro de las tres semanas precedentes y, correlación con datos de laboratorio sin que se puedan confirmar cambios microangiopáticos.

## C- Posible:

Reporte inicial basado exclusivamente en la clínica, antes de obtener los datos de laboratorio.

## Clínica y laboratorio

### A- Etapa Prodrómica

- 1- Forma típica o post-enteropática: en la mayor parte de los pacientes (89%), el cuadro se inicia por una diarrea frecuentemente sanguinolenta, dolor abdominal, distensión y vómitos, de pocos días de duración y con escasa fiebre, que luego de un periodo libre, de horas a pocos días, sobreviene la fase aguda del padecimiento.
- 2- Forma atípica: no asociada a diarrea, con menor frecuencia, es precedido por una infección de las vías respiratorias superiores con un periodo intermedio sin síntomas de 1-10 días, luego de los cuales aparece la etapa aguda.

### B- Etapa Aguda

- 1- Inicio súbito de anemia hemolítica microangiopática Coombs negativa generalmente severa, que evoluciona con crisis de hemólisis.
- 2- Trombocitopenia (púrpura, equimosis, hemorragia de mucosas).
- 3- Nefropatía, con insuficiencia renal aguda, oligoanuria, con una duración promedio de 14 días, que se acompaña de las habituales complicaciones metabólicas y hemodinámicas tales como acidosis, hiperkalemia (la más seria), hiponatremia e hipervolemia. En ocasiones hay compromiso del SNC, con somnolencia, convulsiones y hasta coma. Otros datos pueden comprender hepatoesplenomegalia, dolor abdominal grave, hipertensión (1/3 de los niños) e insuficiencia cardíaca.

Según el grado de disfunción renal, se clasifica en:

- Leve: oliguria (volumen urinario menor a 300 ml/m<sup>2</sup>/24hs), < 7 días
- Moderado: oliguria 7-14 días o anuria ≤ 7 días
- Severo: oliguria > 14 días o anuria > 7 días.

Podríamos clasificar los síntomas en tempranos y tardíos, como se muestra en el cuadro II.

## Examen de laboratorio

- 1- Función renal: urea elevada, creatinina elevada.
- 2- Electrolitos plasmáticos: Na<sup>+</sup> bajo, K<sup>+</sup> elevado, calcemia disminuida, fosfate-mia normal o ligeramente elevada.
- 3- Hemograma, anemia severa, generalmente con hemoglobinas promedio de 6 g/dl, con glóbulos rojos en forma de casco y fragmentados, asociados a trombocitopenia con macroplaquetas (generalmente con valores menores a 60 mil/ml) y recuento de glóbulos blancos elevados moderadamente generalmente mayores a 20 mil/ml. El recuento de reticulocitos está elevado; Coombs negativo indica que la anemia no está mediada inmunológicamente. Si la anemia es severa puede observarse hemoglobina libre en plasma.
- 4- Los estudios de coagulación, TP, KPTT y fibrinógeno pueden dar normales o anormales. Puede haber fibrinólisis con elevación de los productos de degradación de fibrina.
- 5- Valores elevados de LDH y bilirrubina reflejan una hemólisis intravascular. La bilirrubina rara vez exceda los 2-3 mg/dl. La haptoglobina está muy disminuida.

## Cuadro II

Síntomas tempranos	Síntomas posteriores
Fiebre	Gasto urinario bajo (oliguria)
Diarrea	Gasto urinario nulo (anuria)
Sangre en heces	Palidez
Irritabilidad	Distensión abdominal o aumento del perímetro abdominal, por aumento del tamaño del hígado y bazo
Debilidad	Magulladuras
Letargia	Erupción cutánea en forma de pequeños puntos rojos (petequias), coloración amarillenta de la piel (ictericia)
Heces con olor fétido	Disminución del nivel de estado consciente, convulsiones

6- Orina completa: lo esperable es que sea nefrítica: con hematuria, cilindru-ria y proteinuria.

7- Imágenes ecográficas, ecografía renal por Doppler, ecografía abdominal-TAC cerebral-ECG características.

8- Coprocultivo: para la detección de algún tipo de E. Coli, u otro patógeno productor de toxina Stx.

9- Biopsia de riñón que revela cambios histológicos, diagnósticos de esta enfermedad.

## Diagnóstico diferencial

Pueden plantearse diversos diagnósticos, de acuerdo al momento evolutivo en que sea examinado el paciente:

Durante la etapa inicial de colitis hemorrágica, descartar: infecciones intestinales por Shigella, Yersinia, Campilobacter, Rotavirus, etc; causas quirúrgicas, invaginación intestinal, infarto colónico, hemorragias y necrosis intestinal.

Durante la fase aguda, es un cuadro clínico muy típico, pero debe diferenciarse con la PTT fundamentalmente en niños mayores. Este cuadro es más grave, con recaídas frecuentes y mayor compromiso neurológico. Descartar otras causas de anemia e insuficiencia renal aguda.

## Bibliografía

- Comité de Nefrología,- ARCH Arg pediatri 1995; 93:409-411.
- Simposio Internacional Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires octubre, 1999. Medicina 2000; 60: 46-58.
- Drummond K. - N Engl J Med 1985; 312: 116-118.
- Kaplan B. - Pediatr Nephrol 1990; 4:276.