

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA COMO PRUEBA ALTERNATIVA PARA LA CONFIRMACION DIAGNOSTICA DE INFECCION POR VIH EN EL PERU

Valverde Ada¹, Romero Soledad¹, Cabezas César¹

RESUMEN

Desde 1990 en el INS-Perú se viene utilizando la técnica de Western Blot (WB) para la confirmación del Diagnóstico de VIH. En este estudio se evalúa la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) como una alternativa de confirmación al Western Blot. Se utilizaron 132 sueros de la seroteca de la División de Virología del INS-Perú con diagnóstico previo de VIH por WB. Para el diagnóstico de IFI se usó un Kit producido en el Centro Nacional de Referencia de SIDA(Chile-Argentina). De los 132 sueros procesados 56(42,4%) correspondieron a Western Blot positivo, 52 (39,4%) a Western Blot negativos y 24(18,2) con Western Blot indeterminado.

La sensibilidad y especificidad de la técnica IFI en comparación con la de Western Blot fue de 98,2% y 98% respectivamente. Los valores predictivo positivo y negativo fueron 98,2% y 100% respectivamente. Estos resultados permiten incorporar a la técnica de IFI como una prueba alternativa para la confirmación del diagnóstico de infección por VIH.

Palabra clave : VIH/SIDA, diagnóstico IFI.

ABSTRACT

Since 1990, the National Institute of Health-Peru(INS) has performed the performed the Western blot technique to confirm HIV diagnosis. This study evaluates Indirect Immunofluorescence test (IFI) as an alternative of confirmation by Western blot. One hundred and thirty-two sera from the Virology Serum Bank at INS previously tested by Western blot were submitted to IFI testing using a kit produced at the AIDS National Reference Center (Chile-Argentina). A total of 56 (42,4%) of the 132 processed sera were Western blot positive, 52 (39,4%) were W. blot negative and 24 (18,2%) were W. blot indeterminate.

Sensitivity and specificity of the IFI test as compared to Western blot's was 98,2% and 98% respectively. Positive predictive value was 98,2% and negative predictive value was 100%. These results allow us to add the IFI test as an alternate confirmation test for HIV.

Key word : HIV/AIDS, immunofluorescence, diagnostic, IFI.

INTRODUCCION

Desde la aparición del SIDA en el mundo en 1981, y luego del descubrimiento del VIH, se han venido desarrollando técnicas de diagnóstico para VIH¹. Actualmente se cuenta con las técnicas rápidas, ELISA, Western Blot(WB), Inmunofluorescencia (IFI), Radio inmuno precipitación (RIPA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR)²; sin embargo en los países en vías de desarrollo, la

aplicación de todas estas técnicas son limitadas. Para las pruebas de tamizaje se utilizan las pruebas rápidas y la técnica de ELISA, las cuales no están libres de resultados falsos positivos, pues tienen especificidad menor al 100% siendo necesaria la realización de pruebas confirmatorias como el WB e IFI.

Una técnica con alta sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra VIH como el WB se viene utilizando en el Perú, sin embargo su alto costo impide que se le

¹ Laboratorio Nacional de Referencia de VIH/SIDA, Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, A.P. 451, Lima - Perú.

adopte como una técnica rutinaria de confirmación de la infección por el VIH.

Una técnica con alta sensibilidad y especificidad como la IFI es una prueba confirmatoria alternativa recomendada por la OMS², con la ventaja adicional de ser más económica que las otras pruebas confirmatorias. Siendo importante el desarrollo de tecnologías que se adapten a la realidad latinoamericana, en la IV Reunión de Directores de Laboratorios de Referencia de SIDA (Costa Rica 1991)^{3,4} se mostró el interés de los países en el uso e implementación de la técnica de IFI como prueba suplementaria, siendo uno de los acuerdos que Chile-Argentina, produzcan y estandaricen los reactivos para IFI, para ser suministrados a 10 países latinoamericanos que soliciten participar en el «Proyecto de IFI para el diagnóstico de VIH en Latinoamérica», con el auspicio de la OPS/OMS. Dentro de este marco realizamos un estudio comparativo de las técnicas de IFI y WB en el Instituto Nacional de Salud del Perú, con el objetivo de considerar la incorporación de la técnica de IFI en la confirmación de infección por el VIH.

MATERIALES Y METODOS

Muestras biológicas

Se incluyeron para el estudio; 132 sueros que previamente habían sido procesados por la técnica del WB, procedentes de la seroteca de la división de Virología del Instituto Nacional de Salud, Perú.

Estos sueros fueron sometidos a la prueba de IFI, para lo cual se utilizó un Kit producido en el Centro Nacional de Referencia de SIDA (Argentina-Chile) del Lote 1-2-3-4 (Junio 1994). Dicho Kit contenía el Antígeno H9+ VIH Subtipo B, conjugado Cappel a la dilución 1/160 y dilución de muestra 1/10.

Principios del ensayo

Si en el suero del paciente existen anticuerpos anti VIH, estos se unirán al antígeno viral que está en las células adheridas al portaobjeto. Este complejo es detectado mediante la adición de anti-inmunoglobulina humana conjugada con fluoresceína al pocillo. Finalmente la reacción es observada mediante un microscopio de fluorescencia.

Procedimientos

Para el procedimiento se utilizó la técnica estandarizada para la realización de la prueba IFI⁵, y para la lectura se utilizó un microscopio de fluorescencia de epiluminación marca Carl-Zeiss

Jenamed, corredera de filtro 510 para luz ultravioleta y objetivos de 40X y 100X.

Interpretación de resultados

El suero control positivo presentaba fluorescencia en el 25% de las células con la morfología típica del antígeno. El suero control negativo y el control de PBS no presentaban fluorescencia. Para la interpretación se consideraron los siguientes criterios:

* Reacción positiva: Fluorescencia típica de membrana en el número correcto de células según control positivo (Fig. 1)

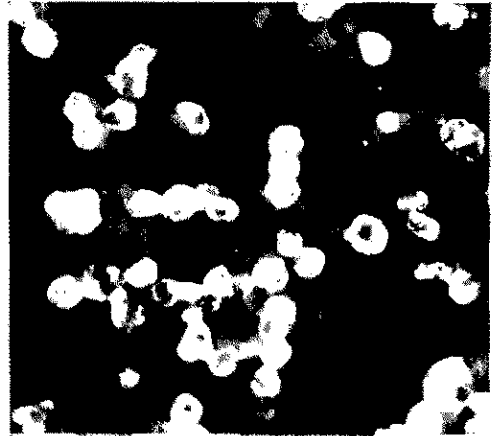


Figura 1. Reacción positiva en IFI

* Reacción negativa: Ausencia de fluorescencia. Fig. 2

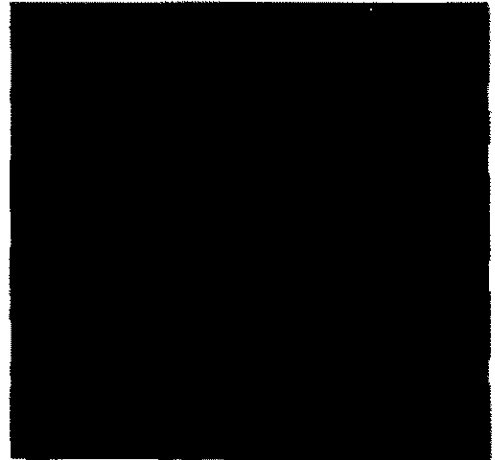


Figura 2. Reacción negativa en IFI

* Reacción inespecífica: Presencia de fluorescencia en células infectadas y no infectadas que impide la interpretación correcta.

RESULTADOS

De los 132 sueros incluidos, 56(42,4%) correspondieron a WB positivos, 52 (39,4%) WB negativos y 24(18,2%) a WB indeterminado. Los resultados comparativos del ensayo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ensayo comparativo entre las pruebas de Western Blot e IFI.

IFI	Western Blot		
	Positivo	Negativo	Indeterminado
Positivo	55	01	1
Negativo	0	51	09
Inespecífico	01	0	14
Total	56	52	24

La sensibilidad y especificidad de la prueba de IFI en comparación con la de WB fue de 98,2% y 98% respectivamente.

Los valores predictivo positivo y predictivo negativo fueron 98,2% y 100% respectivamente, para la misma comparación de dichas pruebas.

DISCUSION

La efectividad de las pruebas de diagnóstico para el SIDA depende de variables, como el momento de la infección en el que se tomaron las muestras, la competencia técnica del personal de laboratorio, la calidad de los especímenes y del equipo, el tipo de prueba, los controles usados para validar la prueba y la estrategia de la misma². La prueba de ELISA es la que usualmente se realiza para el tamizaje de infección por VIH, mientras que el inmunoblot o Western blot, es la prueba de confirmación más comúnmente utilizada, sin embargo su elevado costo y la falta de recursos de los pacientes y de los programas de control impide adaptarla como para ser utilizada como prueba confirmatoria en nuestro país.

La prueba de Inmunofluorescencia indirecta, que se utiliza también para la confirmación diagnóstica, teniendo una sensibilidad y especificidad similar al WB, tienen la ventaja de su menor costo, el menor tiempo y la simplicidad de su ejecución^{6,7}.

Diferentes estudios efectuados con la IFI han mostrado una sensibilidad y especificidad del 99% y 98,9% respectivamente^{1,2}.

En nuestro estudio se obtuvo 98,2% de sensibilidad y 98% de especificidad, esta sensibilidad es similar a la del WB, sin embargo la

menor especificidad alcanzada tiene el inconveniente de presentar falsos positivos aunque en un bajo porcentaje. Estos hallazgos han sido discutidos en otros estudios en los que se indica que pueden darse incluso falsos negativos por IFI en muestras de pacientes que no tenían alto riesgo de infección por VIH¹. Es probable que al incrementar el tamaño muestral este porcentaje sea significativamente menor. Un aspecto que debe considerarse cuando se utiliza IFI es la capacidad del personal que permite una menor variabilidad en los resultados; por lo que cuando se empieza a utilizar esta técnica debe siempre compararse con el patrón de confirmación que es el WB antes de ser sustituido por el IFI.

En relación a los resultados inespecíficos (1,51%) la alternativa es repetir la prueba con una dilución de 1:100; si aún con esto no se tiene un resultado concluyente, se recurre al WB.⁸

Los resultados obtenidos en este estudio, nos permitirán incorporar a la técnica IFI como una prueba alternativa para la confirmación diagnóstica de infección por el VIH quedando el WB para ser utilizado en los casos en los que la IFI resulte inespecífico. Adicionalmente la incorporación de la IFI reducirá significativamente los costos, permitiendo también la transferencia de esta tecnología a los laboratorios de referencia regional.

BIBLIOGRAFIA

1. Carlson JR and et al. Comparison of Indirect immunofluorescence and Western Blot for detection of Anti HIV Antibodies. *J Clin Microbiol* 1987;25:494-97
2. Gallo D and et al. Comparison of detection of antibody to the AIDS Virus by EIA, IFI and WB methods. *J Clin Microbiol* 1986;23:049-51.
3. Manual de Técnica de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico del virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1. Proyecto de IFI para el diagnóstico del VIH en Latino-América, Programa de SIDA/ETS, OPS/OMS. 1994.
4. Constantine NT, Callagan JD and Watts DM. Pruebas para la detección del VIH y Control de calidad. Guía para personal de Laboratorio. Carolina del Norte EE.UU 1991.
5. Manual de Normas y procedimientos para el diagnóstico de Laboratorio del VIH. Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 1992.
6. Blumberg RS, Sandstrom EG, Parodis TJ et al. Detection of human T cell lymphotropic virus type III related antigens and antihuman T. cell lymphotropic virus type III antibodies by anticomplementary immunofluorescence. *J Clin Microbiol* 1986;23:1072-77
7. Allan JS, Ciligan JE, Lee TH, Sodvoski JG. Immunogenic nature of a pool gene product of HTLV III/LAV. *Blood* 1987; 69:331-33
8. Schochetman G, George JR. AIDS Testing. 2nd Ed. Springer-Verlag New York; 995.