

PopUesta MSA

Año 2

Nº 2



**INSTITUTO BOLIVIANO DE
BIOLOGIA DE ALTURA**

**ANUARIO
1989-1990**

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
MINISTERIO DE PREVISION SOCIAL Y
SALUD PUBLICA
COOPERACION TECNICA DE FRANCIA

Estudio de despistaje de anticuerpos Anti-VIH por método inmunoenzimático en grupos de riesgo bolivianos

*Edgar Revollo, Jaqueline Farah, Rosario de Zamora, **Angel Quiroga

Abstract

During a campaign against AIDS, 1203 subjects were screened. 1025 of them belonged to different risk groups, whereas the remaining 178 subjects were blood donors, draftees and others.

In these groups antibodies against HIV (Human Immunodeficiency Virus) or HTLV (Human T-Lymphotropic Virus Type III) were investigated. For this purpose an indirect immunoenzymatic technique was used.

Only one homosexual drug addict was found to have Ac-anti HIV. The positivity was confirmed by the Western-Blot technique.

Eventhough the screened sample was small, the fact that only one positive result was found, suggests that AIDS is not yet a public health problem in our country.

Resumen

Iniciando la campaña contra el SIDA propuesta por el CNLS (Comité Nacional de Lucha contra el SIDA); se estudiaron 1.203 sujetos pertenecientes en su mayor parte a grupos de riesgo, 11 individuos del Instituto de Farmacodependencia (0,91%); convictos 622 (51,70%); meretrices 392 (32,58%). Los restantes son sujetos extraídos de diferentes grupos: donantes de sangre, conscriptos, cadetes y otros y que suman en total 178 (14,79%):

En estos grupos claramente definidos y con diferentes posibilidades de contacto con personas infectadas se estudiaron los anticuerpos contra el virus VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) o HTLV (Human T-Lymphotropic Virus Type III) responsable del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

La técnica empleada para el efecto es una prueba con base inmunoenzimática indirecta que sirvió para la detección de anticuerpos asociados al virus VIH en el suero de los sujetos investigados .

Los resultados nos hacen pensar pese a que la muestra es muy pequeña, que el problema SIDA, en nuestro medio no es todavía preocupante; solamente un solo sujeto es seropositivo (tiene Ac-antiVIH en su suero) y pertenece a un

* Dpto. de Inmunología IBBA.

** Inst. del Torax La Paz.

grupo de riesgo muy importante (es homosexual y drogadicto). Esta única positividad significa el 0.08% de las muestras y además fue confirmada con la técnica de Western-Blot.

Introducción

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida es un proceso patológico reconocido y descrito en 1981 y producido por un retrovirus humano el denominado VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) (1).

Se manifiesta por un cuadro clínico producto de enfermedades oportunistas o neoplasias que aprovechan para su presentación del déficit principalmente de la inmunidad celular (2-3).

De esta manera el concepto de SIDA está ahora bien definido por tres parámetros:

- 1.- Existencia de una enfermedad que demuestra déficit de la inmunidad celular.
- 2.- Que la enfermedad se manifiesta en un sujeto que no presente ninguna otra causa conocida de déficit del sistema inmunitario.
- 3.- Presencia de manifestaciones biológicas de infección por el VIH y de signos biológicos de alteración de linfocitos CD4 (serología VIH positiva y/o evidencia de presencia de virus VIH, número disminuído de linfocitos CD4 y relación CD4/CD8 disminuída).

Esta enfermedad constituye un problema mundial y desde luego un reto mayúsculo, pues involucra el resolver ciertas alteraciones de tipo socio-económico sobrevenidas últimamente en el mundo, y es por eso que antes de plantear soluciones para combatir este problema se debe conocer su verdadera profundidad en cada país, de ahí la razón por la cual nosotros emprendimos este trabajo en nuestro medio.

Nos encontramos verdaderamente preocupados, tanto las autoridades de la Dirección Nacional de Epidemiología y Enfermedades de Transmisión Sexual del Ministerio de Salud, como los investigadores del Departamento de Inmunología del Instituto Boliviano de Biología de Altura, por la enorme proliferación del mal a nivel mundial, de este hecho no puede estar aislado nuestro país. Los siguientes datos son muy significativos:

- La OPS estima que entre 2 y 2.5 millones de personas ya están infectadas por VIH en las Américas; Aproximadamente de 500.000 a 750.000 de estos individuos viven en América Latina y el Caribe. (4).
- El número de casos acumulados hasta septiembre de 1988 en América del Sur es muy importante (5).

- Bolivia	11	casos	Defunciones	6
- Colombia	244	casos	Defunciones	70
- Ecuador	45	casos	Defunciones	26
- Perú	98	casos	Defunciones	53
- Venezuela	207	casos	Defunciones	137
- Argentina	197	casos	Defunciones	112
- Chile	83	casos	Defunciones	36
- Paraguay	8	casos	Defunciones	8
- Uruguay	26	casos	Defunciones	13
- Brasil	11070	casos	Defunciones	5555

(Datos sujetos a revisión)

La incidencia en cada país no se conoce exactamente, sin embargo el total de casos anuales notificados sobre la población a mitad del año proporciona una estimación aproximada para el año en cuestión. Esta técnica aunque sujeta a limitaciones proporciona un método aceptable para comparar con el SIDA en diferentes países.

En América Latina y el Caribe, el número de casos de SIDA se duplica cada seis a ocho meses (OPS).

El conocimiento de estos datos ha hecho que el Ministerio de Salud, conjuntamente con instituciones ligadas al problema salud en nuestro país, cree el Comité Nacional de Lucha Contra el SIDA. Sus labores son ante todo el programar y coordinar todas las acciones referentes al control del SIDA. Dentro de este cometido se ha declarado como prioritario el estudio de la incidencia de esta enfermedad en nuestro medio, mediante la detección serológica de anticuerpos anti virus por la técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), sancionada como aceptable por su sensibilidad y especificidad en todo el mundo.

La idea de que un sujeto seropositivo, es decir que tiene Ac antiVIH significa que ese organismo ha tenido contacto alguna vez con el virus y de ninguna manera se le debe considerar como "sidótico". Es así que debemos recalcar lo siguiente para apoyar esa aseveración:

- Cuando el virus VIH ingresa al organismo, desde las dos semanas luego de la infección hasta los seis meses se produce una especie de primoinfección (20 a 30% de los infectados presentan manifestaciones pseudogripales) y la serología se vuelve positiva (los enfermos comienzan a fabricar anticuerpos contra el virus)
- Luego de los seis meses hasta los siete años, si estudiamos a 100 seropositivos vemos que un tercio son portadores del virus sin síntomas, otro tercio sufren de un denominado COMPLEJO RELATIVO AL SIDA

(ARC), con síntomas de poca intensidad (aumento de volumen de ganglios, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna, herpes) y otro tercio adquieren una forma más grave de la infección, es decir, el SIDA (cuya concepción de descripción señalamos más arriba).

- Después de los 7 años los serepositivos, tienen todavía buena salud y esto expresa el hecho de que la evolución hacia la enfermedad puede ser más tardía y que el tiempo máximo del período de incubación todavía es desconocido.
- La enfermedad se presenta con más frecuencia en grupos de individuos cuidadosamente identificados: Homosexuales, toxicómanos que utilizan drogas por vía intravenosa, sujetos que reciben frecuentemente transfusiones de sangre y grupos étnicos como haitianos y africanos.(6-7).
- Han sido aislados varios retrovirus de los linfocitos de enfermos con SIDA: el primero fue aislado en Francia y fue denominado LAV (Virus asociado a la linfadenopatías) (8). Un segundo (HTLV) y un tercer virus fueron aislados en EEUU (9-10). Actualmente el virus es donominado VIH.

Los análisis genéticos (secuencia de ADN viral) (11) han demostrado que los virus VIH son análogos a los retrovirus humanos conocidos.

La estructura de la proteína de envoltura, el gen, la no transformación de las células infectadas y el tropismo hacia los tejidos nerviosos hacen que el virusVIH sea considerado como un lentivirus.

Se multiipican in vitro en los linfocitos T auxiliares inductores CD4 e in vivo destruyen los fagocitos profesionales y los CD4, lo que explicaría la disfunción inmunitaria en estos pacientes.

Se han evidenciado partículas virales infecciosas en muchos líquidos biológicos: sangre, líquido céfalloarraquídeo, líquido seminal, saliva, lágrimas, leche, en estado libre o asociados a las células sensibles.

Se observa en los enfermos y en los portadores sanos, anticuerpos anti VIH que son "signalécticos" débilmente neutralizantes.

Estos anticuerpos pueden ser detectados (objetivo del presente trabajo, por el método inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) (12-13-14), por inmunotransferencia (Western Blot) (15) o por radioinmunoprecipitación (RIPA) (16-17).

La técnica empleada por nosotros es una técnica inmunoenzimática (ELISA) donde se detectan anticuerpos antivirales en el suero de los investigados.

Cabe señalar por último que la presencia de esos anticuerpos, no determina por sí sola el diagnóstico de SIDA ni conduce a la predicción de evolución hacia la infección por el virus. El diagnóstico debe ser establecido por el médico a base de la historia clínica del enfermo.

Material y Método

Fueron estudiados 1.203 sujetos pertenecientes a los siguientes grupos: (ver tabla I)

Tabla I

Centro	Nº muestras	%
- Instituto de Farmacodependencia	11	0.91
- Cárcel de hombres La Paz	463	38.48
- Cárcel de mujeres La Paz	67	5.56
- Cárcel de hombres Potosí	32	2.66
- Cárcel de mujeres Potosí	22	1.82
- Cárcel de hombres Cochabamba	38	3.15
- Meretrices Cochabamba	122	10.14
- Meretrices La Paz	106	8.81
- Concriptos La Paz	57	4.73
- Cadetes	40	3.32
- Donantes sangre INST. Tórax La Paz	61	5.07
- Sujetos de diferente procedencia	20	1.66
- Meretrices de otra procedencia	164	13.63
Total	1.203	99.94

Procedencia y número de muestras estudiadas.

Se empleó la técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), es una técnica inmunoenzimática indirecta para la detección de diferentes anticuerpos asociados al virus con el suero o plasma humano.

La técnica se fundamenta en la utilización de una fase sólida que contiene los antígenos virales purificados e inactivados y un anticuerpo de cabra anti IgG humana purificado por cromatografía de afinidad y un conjugado con peroxidasa.

Los sueros a investigar y los sueros control se distribuyen en los pocillos sensibilizados de las microplacas.

Si los anticuerpos anti VIH están presentes se ligan a los antígenos virales fijados en la fase sólida.

Después de un lavado se añade el anticuerpo anti IgG Humano marcado con peroxidasa. Este se liga a su vez a las IgG retenidas en la fase sólida.

La presencia de la enzima inmovilizada en los complejos se revela por incubación, añadiendo el sustrato tras eliminación por lavado de la fracción del conjugado que haya quedado libre. Al detener la reacción se efectúa la lectura en el espectrofotómetro a 4492 NM/520 NM. Comparando las absorbancias observadas en las muestras respecto a la del suero control de umbral, permite concluir la presencia o ausencia de anticuerpos anti VIH.

Resultados

El estudio de 1.203 sueros agrupados como se ve en la Tabla I, ha tenido como resultado el determinar ciertas prevalencias, como por ejemplo que la mayoría de los individuos estudiados pertenecen a grupos de riesgo (ver Tabla II).

Tabla II

Grupos de Riesgo	%
- Cárceles	51.70
- Meretrices	32.58
- Drogadictos	0.91
Total	85.19
Grupos de no Riesgo	%
- Donantes de sangre	5.07
- Concriptos, cadetes y sujetos de otra procedencia	9.72
Total	14.79

Relación entre sujetos que pertenecen a grupos de riesgo y los que pertenecen a otros grupos que no son considerados de riesgo.

La mayoría de los sujetos estudiados son del sexo masculino. (ver Tabla III).

Tabla III

Sexo	%
Masculino	59.85
Femenino	40.14
Total	99.99

Sexo de los sujetos investigados.

Los valores de densidad óptima (INDICES ELISA) considerados en el estudio son demostrados en la Tabla IV.

Tabla IV

Densidad Optica	Interpretación
0.0. entre 0.25 - 1.00	Consideración como positivo
0.0. entre 0.00 - 0.10	Consideración como negativo

Indice ELISA para determinar la positividad o la negatividad de las muestras séricas.

Los índices ELISA encontrados en los sueros procesados en la investigación pueden ser observados en la Tabla V.

Tabla V

Indice Elisa	% de Muestras
Superior a 0.0,25 D0	0.00
Inferior a 0.10 D0	99.91
Total	99.99

Porcentaje de muestras en relación al INDICE ELISA.

Las muestras de suero con índices superiores a 0.254 o más han sido definidas como positivas para los anticuerpos antiVIH, en el estudio ésta es la situación de un solo suero.(0.08%) Tabla VI.

Tabla VI

ELISA para Ac. anti VIH	Positivo (+)	1
	Negativo (-)	1.202

En la tabla VII vemos los resultados según los grupos.

Tabla VII

Grupo	Nºde investigados	+	-	%
Instituto de Fármacodependencia	11	0	11	0,91
Cárceles	622	1	621	51,70
Meretrices	392	0	392	32,58
Donantes de sangre Cadetes				
Concriptos y sujetos de otra procedencia	178	0	178	14,79
Total	1.203	1(+)	1.202 (-)	99,98 %

Número de sueros positivos en relación a la procedencia.

La seropositividad en las diferentes ciudades se encuentra consignada en las correspondientes tablas.

Tabla VIII

Grupos	Nº de Investigados	Elisa (+)	Elisa (-)	%
- Instituto de Fármacodependencia	11	0	11	1,36
- Cárcel de hombres	463	1	462	57,51
- Cárcel mujeres	67	0	67	8,32
- Meretrices	106	0	106	13,16
- Concriptos	57	0	57	7,08
- Cadetes	40	0	40	4,96
- Donantes de sangre Inst. Tórax	61	0	61	7,57
Total	805	1(+)	804 (-)	100 %

Resultados del test ELISA en la investigación de anticuerpos anti VIH en sujetos que pertenecen a la ciudad de La Paz.

Tabla IX

Grupos	Nº de Investigados	Elisa (+)	Elisa (-)	%
- Cárcel hombres	38	0	38	23.75
- Meretrices	122	0	122	76.25
Total	160	0 (+)	160 (-)	100%

Resultados de la ciudad de Cochabamba

Tabla X

Grupos	Nº Investigados	Elisa (+)	Elisa (-)	%
- Cárcel hombres	32	0	32	59.25
- Cárcel mujeres	22	0	22	40.74
Total	54	0 (+)	54 (-)	100 %

Resultados de la ciudad de Potosí

Tabla XI

Grupos	Nº de Investigados	Elisa (+)	Elisa (-)	%
- Demandas espontáneas	20	0	20	10.85
- Meretrices	164	0	164	89.13
Total	1844	(+)	184 (-)	100 %

Resultados en sujetos de otra procedencia.

Discusión

Este estudio representa uno de los primeros efectuados en Bolivia y resume el trabajo efectuado desde el año 1985 cuando aparecieron los primeros casos de SIDA en nuestro país. En aquella oportunidad los diferentes sueros fueron procesados mediante reactivos proporcionados por el Instituto Pasteur de París (ELAVIA). ELAVIA es una técnica inmunoenzimática que tiene ventajas sobre otros ensayos, pues utiliza una fase sólida de control para evitar las

reacciones positivas falsas. Una reacción positiva falsa, es decir no específica puede presentarse al incubar sueros negativos con las preparaciones que contienen el antígeno vírico, y esto se debe a la presencia de proteínas celulares o séricas parecidas a las proteínas víricas y capaces de fijar de un modo no específico IgG humanas. Para corroborar la buena especificidad del test se han estudiado por diagnóstico Pasteur 3.000 sueros de donantes de sangre, esta investigación no ha revelado ninguna respuesta falsa positiva (lo que significa una especificidad cercana al 100%) No se ha observado tampoco ninguna falsa positiva al procesar sueros de enfermos con otras enfermedades víricas como hepatitis A y B mononucleosis infecciosas, rubeola.

En relación a la sensibilidad de la prueba debemos decir que los resultados obtenidos en un estudio realizado sobre 12.000 sueros tenían completa concordancia (100%) con los resultados del Western-Blot, técnica que se emplea hoy día para confirmar la positividad de un suero (Esta técnica permite individualizar los anticuerpos dirigidos contra cada una de las proteínas virales, entonces sirve para confirmar la seropositividad o descartar las eventuales reacciones no específicas, pues detecta anticuerpos específicamente dirigidos contra las glicoproteínas de envoltura del virus (gp 160, gp 130, gp 41).

En una segunda etapa se investigaron los anticuerpos antivirales con la técnica de VIRGO HTLV III ELISA, con una especificidad y sensibilidad parecidas al ELAVIA.

Pese a la incidencia baja (un solo suero positivo en nuestro estudio) y al escaso número de pacientes con SIDA (11 casos denunciados), debemos considerar el hecho de que posiblemente existan muchas más casos pese a que con la investigación del presente trabajo se trató de abarcar individuos pertenecientes a los llamados grupos de riesgo: convictos, meretrices, drogadictos (no sabemos cuantos usan la vía intravenosa) convirtiéndose el problema en latente hasta el momento. Si consideramos estudios realizados por la OPS (Primera Teleconferencia Panamericana sobre el SIDA, Quito-Ecuador 1987) que concluyen señalando que el número de casos de SIDA en los países de América Latina se duplica cada seis a ocho meses, en el años 1988 ha existido posiblemente 22 casos considerando que las condiciones de vida en nuestro medio son diferentes a los países que tienen gran incidencia. En otras palabras dentro de dos años (1991) tendremos el mismo número de casos que tienen actualmente los países centroamericanos y nuestro problema será entonces preocupante, y debemos estar preparados para ese momento.

Dos cosas más que debemos comentar:

- Conforme pasa el tiempo y las condiciones de turismo incontrolado sean las mismas, las diferentes partes antigénicas del VIH van cambiando,

entonces los test que son específicos hoy día posiblemente no nos sirvan en los años venideros, por eso hay que pensar en una infraestructura para el control de esta enfermedad que sea modificable en el tiempo y que esté siempre actualizada.

- Nuestros estudiados pertenecen a grupos de riesgo y su conducta con seguridad no se modificará en el futuro (cambio de conducta es muy difícil en drogadictos y meretrices, pese a la educación y a la propaganda sobre el problema). Consideramos entonces que muchos de los que son actualmente seronegativos sufrirán una seroconversión lo cual no deja de ser preocupante.
- La técnica de despistaje de realizar solamente una vez la investigación de los Ac. antiVIH es deficiente (de eso estamos concientes en este estudio). Consideramos que son individuos pertenecientes a grupos de riesgo y es por eso creemos que deben ser investigados por los menos, cada dos meses y durante períodos prolongados por lo menos durante seis meses. Sabemos que los anticuerpos se pueden presentar dentro de las dos semanas hasta los seis meses de producido el contagio.

El presente trabajo abre la posibilidad de control eficaz del problema en nuestro país y nos comprueba que las posibilidades técnicas para el efecto son ciertas, por lo menos dentro del campo de la investigación de laboratorio. Los problemas seguramente de tipo económico serán un obstáculo para el tratamiento ideal del problema SIDA en nuestro país. Deseamos que para evitar esto, los organismo internacionales continuen prestándonos ayuda necesaria.

Agradecimientos

Este trabajo tuvo apoyo del Ministerio de Salud.

Agradecemos a la Dra. María Luisa Melgar por habernos proporcionado las muestras séricas de las cárceles y meretrices.

Bibliografía

1. MONTAGNIER L. BRUNET JB et KLATZAMAN D.
El SIDA y su virus. La Recherche, 1985; 16: 750-760
2. ALTER H J EICHBERG J.M.
Transmissions of HTLVIII Infection from Human Plasma to chimpanzees: in animal model for AIDS. Science, 1986; 226; 549-552.
3. KERBAUM S. CAVAILLE-COLL M., KLATZAMANN D. GLUCKMAN J.L. SIMONT T.G.

- Syndromed'immuno deficit acquis (SIDA): Encyc. Mc. Chir. Maladies infectieuses. 1985; 8.002 B10: G-20
4. Primera Teleconferencia Panamericana sobre el SIDA
Quito-Ecuador. Septiembre de 1987.
 5. Segunda Teleconferencia Panamericana sobre el SIDA
Kfo de Janeiro - Brasil. Diciembre 1988.
 6. BARRE-SINOUSSE F, CHERMANN J.G. REY F.
Isolation of T. Lymphotropic Retrovirus from a patient risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Science 1983 220; 868-871.
 7. MONTAIGNER L:
Donnees recentes sur le SIDA. Le Councours Med, 1985; 107; 2.603 - 2.800.
 8. BARRE-SINOUSSE F. CHERMANN J.G., REY F. SAIMOT A.G.
Isolation of a T- lymphotropic retrovirus. Detection of IgG antibodies to LAV in patients with AIDS, The Lancet, 1984 12.52-1256.
 9. POPOVIC M, SRUGADHRAN M.G. READ E. GALLO RC.
Detection isolation and continuous production of cytopathie retro-viruses (HTLVIII) from patients with AIDS and pre AIDS Science, 1984; 224: 497-500.
 10. LEVY J.A. HOFFMAN A.D. KRAMER S.M.
Isolation of lymphocytopathie retroviruses from San Francisco patients with AIDS Science 1984; 225; 840-842.
 11. ALIZON M., SONIGO P, CHERMANN J.C.
Molecula cloning of lymphadenopaty- associated virus, Nature, 1984, 321; 7570760.
 12. BRUN-VEZINET F. BARRE-SINOUSSE F.
Detection of IgG antiboides to lymphadenopathy associated virus by ELISA in patients with AIDS or lymphadenopathy syndrome. The Lancet 1986; 1.252-1.256.
 13. KALYANARAM VS. CABRADILLA C.D. GETCHELL J.P. Antibodies to the core protein of lymphadenopath-associated virus (LAV) in patients with AIDS. Science, 1984;225: 3212-322.

14. ROUZIUX C. BRUN-VEZINET F. COURUOCE A.M. GAZEUHRI C, Inmunoglobulin G. antibodies to Lymphadenopathy Associated virus in differently reated french and belgian hemophiliacs. ANN. Inter. Med. 1985; 102: 476-479.
15. TOWBIN J, STAEHLIN T. GORDON J.
Electrophoretic transfer of proteins from poly acrylamide gels to nitro-cellulose shects; procedure and some aplications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979; 76; 44350-4353.
16. MONTAGNIER L, KRUST B. CLAVEL F. CHAMARET S.
Identication and antigenicity of the major envelope glycoprotein of lymphadenopathy associated virus (LAV) Virology 1985; 144: 288-289
17. LAURENCE J, BRUN-VEZINET F., SCHUTER S.E.
Lymphadenopathy associated viral antibody in AIDS. New England Journal of Med: 1984; 311; 1.269 - 11273