

Evaluación del sistema DAVIH-VIH-2 en el algoritmo de diagnóstico de VIH /sida durante el periodo 2006-2012

Evaluation of the DAVIH-VIH-2 system in the HIV/AIDS diagnostic algorithm during the period 2006-2012

Dayamí Martín Alfonso,^I Dervel Felipe Díaz Herrera,^{II} Carmen Nibot Sánchez^{III}

Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA). San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la validez continua de un sistema de diagnóstico depende del seguimiento constante del desempeño y del perfeccionamiento de los elementos de control de calidad.

Objetivo: evaluar el desempeño del sistema ELISA DAVIH VIH-2 durante su aplicación en el periodo 2006-2012.

Métodos: se estudió la especificidad frente a un grupo de 4 960 individuos con resultados indeterminados o negativos a VIH-1 y a 4 920 individuos seropositivos a VIH-1 en el sistema DAVIH BLOT VIH-1. También se estudió la precisión en los ensayos realizados en el DAVIH VIH-2 por estimación de los coeficientes de variación y la construcción de los gráficos de Lewey-Jennings, y la concordancia de este sistema frente a la prueba rápida Hexagón HIV con el cálculo del índice kappa.

Resultados: La especificidad en ambos grupos fue superior al 98 %; la precisión resultó adecuada ya que los coeficientes de variación fueron inferiores al 15 %, y en los gráficos de control, los valores se distribuyeron dentro de los límites permisibles. En el análisis de concordancia se mostró un índice kappa de 0,946 para una clasificación de concordancia muy buena frente a los resultados en el sistema Hexagón HIV. Con el uso del sistema DAVIH VIH-2, se identificaron 12 nuevos casos de individuos seropositivos a VIH-2 en el periodo estudiado, que representaron el 60 % de los diagnosticados hasta 2012 en Cuba.

Conclusiones: el estudio de estos parámetros de desempeño en el tiempo permiten corroborar lo observado en la etapa de validación analítica del diagnosticador, lo que fundamenta el uso previsto del sistema y la permanencia del Registro Sanitario del diagnosticador a partir del año 2006 en la entidad regulatoria correspondiente, y hace que Cuba cuente con un sistema serológico para la pesquisa del VIH-2 aplicado en el algoritmo de diagnóstico de VIH desde ese año.

Palabras clave: validación analítica; diagnosticador; VIH-2; ELISA.

ABSTRACT

Introduction: continuous validity of a diagnostic system depends on permanent follow-up of its performance and improvement of quality control elements.

Objective: evaluate the performance of the system ELISA DAVIH VIH-2 during its application in the period 2006-2012.

Methods: a study was conducted of the specificity of the DAVIH BLOT VIH-1 system in a group of 4 960 individuals with indeterminate or negative HIV-1 results and 4 920 seropositive individuals. Attention was also paid to the accuracy of assays performed on DAVIH VIH-2 by variation coefficient estimation and development of Lewey-Jennings charts, and agreement of the system versus the Hexagon HIV rapid test with kappa index estimation.

Results: specificity was above 98 % in both groups. Accuracy was appropriate, since variation coefficients were below 15 %, and values were distributed within permissible limits in the control charts. Agreement analysis revealed a kappa index of 0.946 for a very good agreement classification versus the results obtained by the Hexagon HIV system. With the use of the DAVIH VIH-2 system, 12 new HIV-2 seropositive cases were identified in the study period, i.e. 60 % of the cases diagnosed in Cuba until the year 2012.

Conclusions: the study of these performance parameters as time goes by make it possible to corroborate the observations made about the diagnostic medium during the analytical validation stage, substantiating the use foreseen for the system and the permanence of the diagnostic medium in the Health Registry of the corresponding regulatory institution as of the year 2006. It also enables Cuba to have a serological system for HIV-2 screening applied to the HIV diagnostic algorithm since that year.

Keywords: analytical validation; diagnostic medium; HIV-2; ELISA.

INTRODUCCIÓN

La validez continua de un sistema de diagnóstico depende del seguimiento constante del desempeño y del perfeccionamiento de los elementos de control de calidad.¹

En los estudios de validación de los diagnosticadores es usual la evaluación de la precisión en el tiempo con el uso de técnicas convencionales como el cálculo del coeficiente de variación y los gráficos de Lewey-Jennings,² lo cual brinda la seguridad de que los resultados obtenidos en la etapa de desarrollo se cumplen durante el uso previsto del sistema.

En el momento en que se asume una estrategia de diagnóstico para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), se deben tener en cuenta los diversos aspectos epidemiológicos de la zona o país para el que se diseña la estrategia, los cuales condicionan el diseño del algoritmo de diagnóstico que se empleará y dentro de esto también es muy importante la selección de las pruebas a utilizar, las cuales deben ser escogidas en primer lugar por su calidad y por un análisis adecuado de costo-beneficio.³

En Cuba se han seguido las recomendaciones de la Organización Mundial de la salud (OMS) con respecto a la utilización de pruebas secuenciales que resultan más económicas,⁴ así como, el uso de pruebas con elevado nivel de sensibilidad y especificidad que hacen que el costo-beneficio en nuestro país sea muy positivo.³

El algoritmo cubano de diagnóstico del VIH en Cuba como parte de las estrategias del diagnóstico, se lleva a cabo mediante la pesquisa mixta con técnicas inmunoenzimáticas y la confirmación por WB del VIH-1 en una primera etapa. Durante la confirmación, un grupo de muestras pueden resultar negativas o indeterminadas a VIH-1, y en estos casos es necesario determinar si el resultado está sujeto a la presencia de Ac contra el VIH-2 con la realización de un ensayo serológico tipo ELISA específico para VIH-2 y la consecutiva confirmación por WB para este segundo virus.⁵

El sistema DAVIH VIH-2 es un ensayo ELISA indirecto que fue desarrollado para la detección específica del virus VIH-2 en el algoritmo diagnóstico de VIH/sida en Cuba. Los niveles de sensibilidad y especificidad diagnóstica en la etapa de desarrollo superaron el 99 %.⁶ El objetivo de este trabajo fue evaluar el desempeño de este estuche comercial durante su aplicación en el periodo 2006-2012.

MÉTODOS

Se realizó una evaluación del desempeño del sistema DAVIH VIH-2 en el proceso confirmatorio del VIH, tomándose en cuenta los resultados de 9880 muestras de suero de individuos repetidamente reactivos al pesquisaje inicial por el sistema UMELISA HIV 1+2 Recombinant (CIE, Cuba), durante la aplicación del algoritmo cubano de diagnóstico de VIH.⁵

Las muestras para su estudio se agruparon de acuerdo con su reactividad serológica frente a los virus VIH:

Grupo 1 4 960 muestras con resultado reactivo a VIH-1 y 2 en los sistemas UMELISA HIV 1+2 Recombinant (CIE, Cuba) y Vironostika HIV Uniform II Ag/Ab (Biomérieux, Francia) y un resultado negativo o indeterminado a VIH-1 por el sistema confirmatorio de Western blot, DAVIH BLOT (Laboratorios DAVIH, Cuba), con fecha de diagnóstico entre 2006 y 2012.

Grupo 2 4 920 muestras con un resultado reactivo a VIH-1 y 2 en los sistemas UMELISA HIV 1+2 Recombinant (CIE, Cuba) y Vironostika HIV Uniform II Ag/Ab (Biomérieux, Francia) y un resultado positivo a VIH-1 por el sistema confirmatorio DAVIH BLOT (Laboratorios DAVIH, Cuba), con fecha de diagnóstico entre 2006 y 2010.

Se evaluaron los parámetros de especificidad, concordancia y precisión en el tiempo. La especificidad se evaluó en los grupos 1 y 2 según *Ochoa* (2013)⁷ mientras que la concordancia se estimó, de forma relativa al resultado de 710 muestras del grupo 1 que fueron estudiadas además en el sistema Hexagón HIV (Human), Alemania, prueba inmunocromatográfica de flujo lateral para la determinación de la reactividad serológica a ambos virus VIH. La única característica adicional es la fecha de diagnóstico de las muestras (que pertenecen al periodo 2011-2012) y además se utilizó un panel de 20 muestras de suero positivos a VIH-2 de referencia, perteneciente al Laboratorio de Control de Calidad del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (CICDC).

En el estudio de concordancia se utilizó solamente el resultado referente a la reactividad en el Hexagón HIV (Human), Alemania, contra la banda de VIH-2, y se utilizó el sistema confirmatorio de Western blot, DAVIH BLOT VIH-2 (Laboratorios DAVIH, Cuba) para la confirmación de las muestras con un resultado discrepante entre los ensayos DAVIH VIH-2 y Hexagón HIV (Human), Alemania. Para el análisis de los resultados se conformó una tabla de contingencia y se calculó el índice de concordancia kappa.⁷

Se evaluó la precisión del sistema DAVIH VIH-2 en el periodo 2006-2012 y para ello se utilizaron lecturas de DO de tres réplicas de los sueros control positivo y negativo, de 123 series de ensayos realizados en este periodo. Se calcularon la media, la desviación estándar (DE),⁷ y se confeccionaron los gráficos de Lewey-Jennings² utilizando como límite de control superior a $X+2DE$ e inferior a $X-2DE$. Para el análisis de los resultados de la precisión no se tuvieron en cuenta los valores aberrantes en cada serie de ensayo. Se calculó el coeficiente de variación (CV) de los controles positivo y negativo de todos ensayos según *Ochoa*, 2013,⁷ y se utilizó la dócima de Grubbs⁸ para estimar la normalidad muestral en ambos casos.

RESULTADOS

En la tabla se muestran los resultados de la reactividad a anticuerpos específicos contra VIH-2 en el grupo 1. En el sistema DAVIH VIH-2 resultaron reactivas 83 muestras (1,67 %) y 4 877 (98,32 %) fueron no reactivas. Doce de las muestras reactivas (14,45 %) se confirmaron como positivas en el sistema DAVIH BLOT VIH-2 (Laboratorios DAVIH, Cuba), para un porcentaje de seropositividad en este grupo de 0,241 %.

La especificidad en el grupo 1 fue 98,56 %. En el grupo 2, fueron reactivos a VIH-2 en el DAVIH VIH-2, 54 individuos y de ellos, 14 se confirmaron como positivos en el DAVIH BLOT VIH-2 (Laboratorios DAVIH, Cuba), para un nivel de especificidad analítica del 99,18 %.

Tabla. Resultados de la evaluación en el grupo 1 de la reactividad a anticuerpos específicos contra VIH-2

| Año | Muestras reactivas UMELISA VIH-1/2 | Reactivas ELISA DAVIH VIH-2 | Resultado WB (VIH-2) | | |
|-------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------|----|----|
| | | | P | I | N |
| 2006 | 2 703 | 37 | 9 | 2 | 26 |
| 2007 | 707 | 6 | 0 | 3 | 3 |
| 2008 | 490 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 2009 | 126 | 3 | 0 | 2 | 1 |
| 2010 | 134 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 2011 | 384 | 13 | 1 | 5 | 7 |
| 2012 | 416 | 21 | 0 | 0 | 21 |
| Total | 4 960 | 83 | 12 | 13 | 68 |

N: muestras con resultado confirmatorio negativo; P: muestras con resultado confirmatorio positivo; I: muestras con resultado confirmatorio indeterminado.

En el estudio de concordancia se observó la reactividad en la prueba rápida Hexagón HIV en todas las muestras positivas a VIH-1 y en 21 muestras del grupo 1 mientras que en el DAVIH VIH-2 solamente fueron reactivas las 20 muestras positivas a VIH-2 y las 710 positivas a VIH-1 resultaron no reactivas. El resultado confirmatorio de las muestras discordantes entre ambas pruebas mostró que las 21 muestras fueron negativas a VIH-2, por lo que el índice kappa fue de 0,946 para un nivel de concordancia muy buena, así como 97,04 % de correspondencia entre ambos sistemas.

En las [figuras 1 y 2](#) se mostraron los gráficos de Lewey-Jennings de los controles positivo y negativo del sistema respectivamente, evaluados en el periodo 2006-2012. Se cumplieron las especificaciones para los controles positivos y negativos ($DO\ CP \geq 1,00$; $DO\ CN \leq 0,25$ y $\geq 0,05$) en todas las series estudiadas. El 100 % de los ensayos realizados resultaron válidos. La dispersión de todos los valores osciló en el rango de la media $\pm 2DE$.

Se aceptó la normalidad de las series de ensayos según el estadígrafo G (máximo y mínimo), los cuales no excedieron el valor crítico. Se observó en el gráfico del control positivo ([Fig. 1](#)) que se excedió este parámetro en cinco ensayos consecutivos realizados con un mismo lote. El coeficiente de variación de ambos controles no excedió el 20 % (con excepción de los valores que se encuentran por encima de las 2DE en ambos gráficos de Lewey-Jennings) que es el límite aceptado para este tipo de estudio.

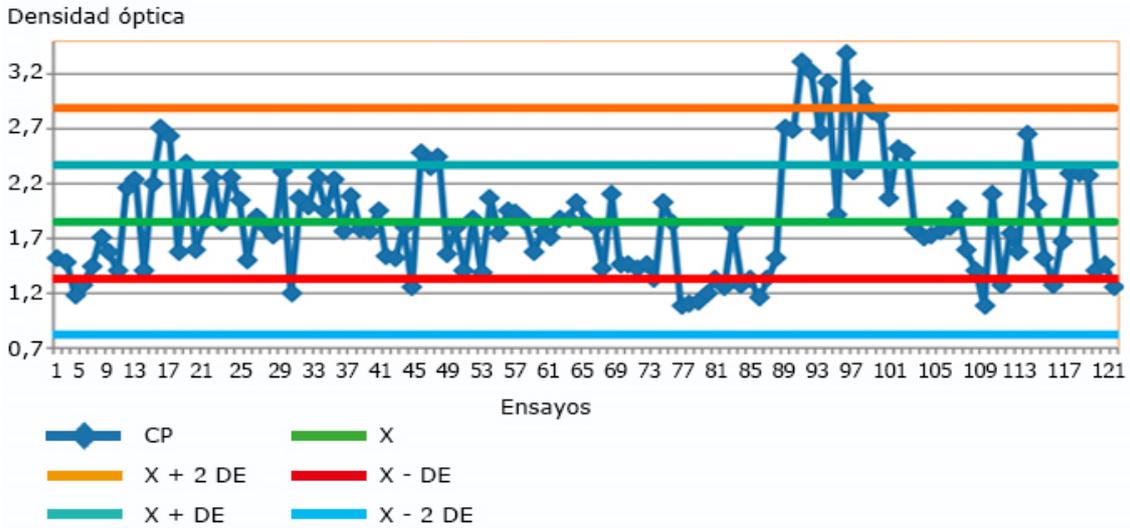


Fig. 1. Gráfico de Lewey-Jennings en el suero control positivo del sistema DAVIH VIH-2.

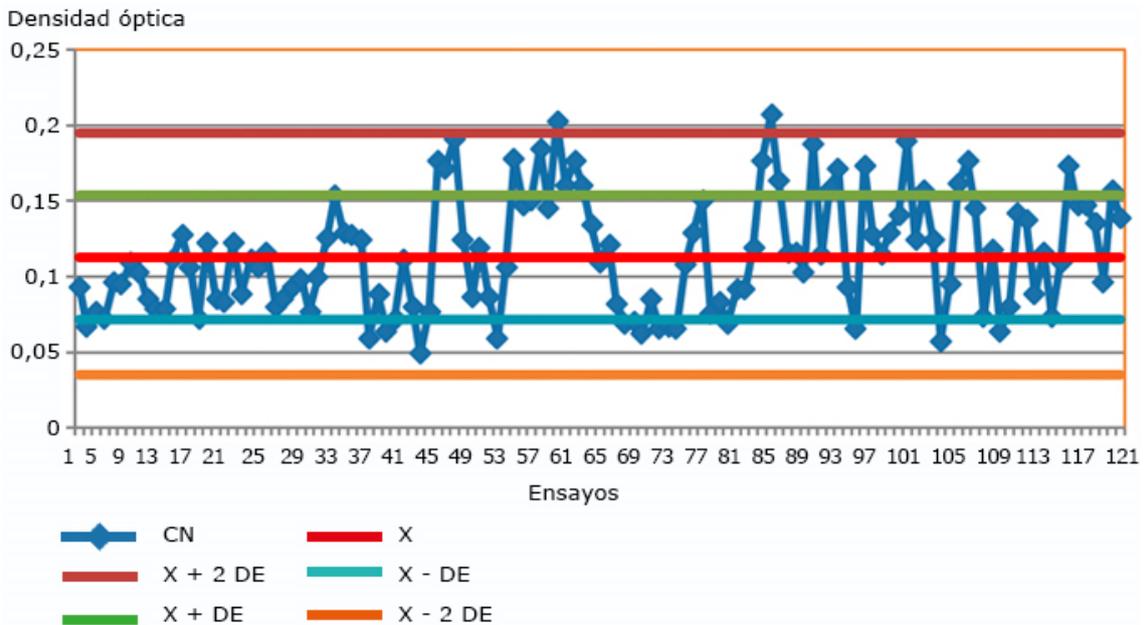


Fig. 2. Gráfico de Lewey-Jennings en el suero control negativo del sistema DAVIH VIH-2.

DISCUSIÓN

En la actualidad, los ensayos de laboratorio mantienen su papel primordial en las decisiones médicas y el 80 % se basan en los resultados obtenidos con el uso de los diagnosticadores;⁹ pero antes de aplicar un sistema de este tipo en el estudio de cualquier enfermedad infecciosa, hay que conocerlo a profundidad, y para ello se deben tener en cuenta un grupo de evaluaciones que permitan concluir que el método que se va a aplicar resultará adecuado para el uso propuesto. Los estudios de poscomercialización también juegan un importante papel en la garantía del uso previsto de los diagnosticadores.¹⁰

La diferenciación entre el VIH-1 y el VIH-2 tiene gran interés clínico, epidemiológico y en la administración de salud porque aunque VIH-2 es menos frecuente, también es cierto que difiere en su epidemiología molecular, la transmisibilidad, la progresión clínica, la disponibilidad de los sistemas para el monitoreo y el perfil de resistencia a los antirretrovirales;^{11,12} por lo que disponer del sistema DAVIH VIH-2 le brinda más fortaleza al algoritmo de diagnóstico establecido en Cuba y también resuelve la demanda del componente de diagnóstico dentro del Programa de Control de la Infección por VIH/sida en nuestro país.

Desde los años de inicio de la epidemia y hasta el 2006, en nuestro país se identificaron 8 individuos seropositivos al VIH-2; sin embargo, con el empleo del DAVIH VIH-2 en solo 10 años se han incorporado 12 nuevos casos de seropositivos a VIH-2, lo que representa el 60 % de los existentes hasta el 2012; lo cual constituye un ejemplo de la utilidad de los medios de diagnóstico en la prevención del VIH con el consecuente beneficio que genera al individuo y a la salud pública en general.

Los niveles de especificidad obtenidos para el sistema DAVIH VIH-2 resultaron similares a las evaluaciones con sueros negativos de referencia⁶ a pesar de que las condiciones serológicas en ambas poblaciones son muy diferentes.

La especificidad en el grupo 1 (98,56 %) resultó ligeramente inferior a la referida por *Martin* y otros, 2007,⁶ cuando evaluaron este sistema frente a muestras de referencia (E= 99,81 %) y es que en este grupo de negativos e indeterminados al WB de VIH-1, la reactividad puede estar dada por la posibilidad de que los individuos se encuentren infectados con VIH-2, por estadios iniciales o finales de la infección por VIH-1 o por el desarrollo de reacciones cruzadas de inmunoglobulinas no específicas por autoanticuerpos o condiciones preanalíticas en la muestra.¹³

También el grupo 2 tiene la probabilidad del desarrollo de reactividad cruzada ya que son muestras con infección confirmada de VIH-1; sin embargo, se obtuvo un valor de especificidad similar al obtenido por *Martin* y otros, 2007,⁶ lo cual es indicativo de la capacidad que presenta el sistema para identificar como no reactivas a las muestras verdaderas negativas con independencia de la condición serológica presente en las mismas. En ambas condiciones, el sistema muestra una alta capacidad para identificar como "no reactivas" a las muestras negativas verdaderas, con independencia de la condición serológica presente, lo cual corrobora lo informado por *Delahanty* y otros¹⁴ acerca del alto grado de especificidad de la secuencia peptídica GP36-5, la cual se encuentra absorbida en la fase sólida del sistema DAVIH VIH-2.

Los 14 individuos del grupo 2 confirmados a VIH-2 se clasificaron como doble reactivos a ambos virus y fueron estudiados por *Díaz* y otros (2012),⁵ en una reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos para VIH-1 y VIH-2, en la cual ninguna de las muestras amplificaron con VIH-2 pero si lo hicieron frente a los cebadores de VIH-1. Este resultado permitió inferir que efectivamente en este tipo de muestras es posible la presencia de reactividad cruzada por anticuerpos específicos contra VIH-1.¹²

Otros autores que también han evaluado estrategias para identificar la doble infección por estos virus, con el uso combinado de técnicas serológicas y el estudio molecular posterior, en ocasiones no han logrado la detección del VIH-2 con las técnicas moleculares que emplearon, como por ejemplo *Ciccaglione* y otros, 2010,¹⁵ que obtuvieron el 32 % de individuos con doble positividad serológica, sin embargo, no lograron la amplificación de ambos virus en una misma muestra.

No obstante, la aplicación del DAVIH VIH-2 como herramienta de pesquisa de doble infección (VIH-1/VIH-2) en nuestras poblaciones representa una fortaleza para la estrategia cubana de diagnóstico.

En este estudio también se mostró lo ya informado acerca de la adecuada precisión del DAVIH VIH-2,^{6,10} el cual ha constituido un producto de una escasa variabilidad en la producción de los lotes en todo este periodo de aplicación. El contar con las herramientas de control o gráficos de Lewey-Jennings² ha permitido mostrar este hecho a través de este tipo de monitoreo de poscomercialización que se ha realizado en la etapa de aplicación del sistema en el algoritmo de diagnóstico.

En las figuras 1 y 2 se observaron algunos valores dispersos que excedieron el límite de la media \pm 2DE; valores estos que pertenecen a series consecutivas en el control positivo. En la revisión de la documentación relativa a este periodo se pudo comprobar que estos ensayos se realizaron con un mismo lote del producto se asociaron a las características de este lote en particular. Con el resultado de ambos métodos se asegura una adecuada precisión para el sistema a lo largo del periodo de aplicación.

Este resultado, como la mayoría de las desviaciones en los resultados de laboratorio, se encuentra asociado a errores operacionales; lo cual solo es posible minimizar si se adoptan las Buenas Prácticas de Laboratorio.¹⁶ *Constantine* y otros, en 1991,¹⁷ afirmaron que solo cuando los valores de control de más de seis series caen a un lado de la curva, se produce una alteración grave en la precisión del sistema en estudio.

De forma general, el estudio de estos parámetros de desempeño en el tiempo permiten corroborar lo observado en la etapa de validación analítica del diagnosticador,^{6,10} lo que fundamenta el uso previsto del sistema y la permanencia del Registro Sanitario del diagnosticador a partir del año 2006 en la entidad regulatoria correspondiente (CECMED), y hace que Cuba cuente con un sistema serológico para la pesquisa del VIH-2 aplicado en el algoritmo de diagnóstico de VIH desde ese propio año.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jacobson RH. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev Sci Tech off Int Epiz.* 1998;17(2):507-26.
2. Trullols E. Validation of qualitative analytical methods. [Tesis Doctoral]. Tarragona, Francia: Universidad Rovira Virgili; 2006.
3. Silva E, Cruz O, Pérez MT, Díaz DF, Hernández M, Díaz HM, et al. Conocimientos básicos para el personal que trabaja en el diagnóstico de laboratorio de la infección por VIH. La Habana: Editorial Lazo Adentro; 2011.

4. Díaz H, Pérez MT, Lubián AL, Nibot C, Cruz O, Silva E, et al. HIV Detection in Cuba: Role and Results of the National Laboratory Network. *Medic Review*. 2011 [citado 11 jun 2017];13(2):9-13. Disponible en: <http://www.papers.ssm.com/sol3/papers.cfm?abstractid=217111>
5. Díaz DF, Ortiz E, Cruz O, Blanco M, Martín D, Machado LY, et al. Application of algorithm for the diagnosis of HIV -1 / HIV-2 double infection in Cuba. *First Reports BIT'S 2nd Annual World Congress of Microbes WC9-2012*. 2012.
6. Martín D, Silva E, Pérez MT, Díaz DF, Romero K, Díaz HM, et al. Diseño y evaluación del sistema DAVIH VIH-2. *Rev Cubana Med Trop*. 2007;58(3):23-6.
7. Ochoa R. Técnicas inmunoenzimáticas en el desarrollo clínico de vacunas. Sección I. Normalización y validación de técnicas inmunoenzimáticas. La Habana: Ediciones Finlay; 2013.
8. Organización Internacional de Epizootias (OIE). *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Principles of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases, Part I, Cap I.1.5*. 2013.
9. International Standardization Organization (ISO). Norma ISO/CD 18113-1. Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic tests systems. *In vitro* diagnostic medical devices. Information supplied by the manufacturer (labelling) - Part 1: Vocabulary and general requirements. 2006.
10. Martín D. Evaluación de la estabilidad del sistema DAVIH VIH-2. *Rev Cubana Med Trop*. 2015;67(2).
11. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention. *Lancet*. 2014;384(9939):258-71.
12. Rosenberg NE, Pilcher CD, Busch MP, Cohen MS. How can we better identify early HIV infections? *Curr Opinion in HIV & AIDS*. 2015;10(1):61-8.
13. Ortiz R, Eirós JM. Pruebas de diagnóstico serológico de la infección por VIH. *Control de Calidad SEIMC, 2011* [citado 11 jun 2017]. Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisiones sistematicas/serología/VIHrev02.pdf>
14. Delahanty A, Bequer DC, Hernández M, Zulueta O, Hernández I, Ramos G, et al. Desarrollo de un ensayo sandwich de doble antígeno para la detección de anticuerpos contra el VIH-2 empleando un péptido sintético biotinilado de la proteína gp36. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2014 [citado 11 jun 2017]. Disponible en: <http://www.enfinfecc/vih.com/insite.jsp>
15. Ciccaglione AR, Miceli M, Pisani G, Bruni R, Ludicone P, Costantino A. Improving HIV-2 detection by a combination of serological and nucleic acid amplification test assays. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2902-8.
16. Ministerio de Salud Pública de Brasil. *Manual Técnico para el diagnóstico de la infección por VIH*. 2013 [citado 21 jul 2017]. Disponible en: <http://www.aids.gov.bras>

17. Constantine NT, Callaham JD, Watts DM. Pruebas para la detección del VIH y control de calidad. Guía personal de laboratorio. Durham, Carolina del Norte: AIDSTECH/Family Health International; 1991. p. 62-6.

Recibido: 2 de diciembre de 2016.
Aprobado: 4 de diciembre de 2017.

Dayamí Martín Alfonso. Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA). Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: cicdc@infomed.sld.cu