



ORIGINAL

Seroprevalencia del VIH en población atendida en un Servicio de Urgencias: análisis por lotes de sueros

I. Gracia Ahufinger^a, S. Tamames Gómez^b, J.M. Eiros Bouza^{a,*}, A. Tenorio Abreu^a, S. García de Cruz^a, J.J. Castrodeza Sanz^b y R. Ortiz de Lejarazu Leonardo^a

^aServicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Valladolid. España

^bSección de Medicina Preventiva y Salud Pública. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Valladolid. España

Aceptado para su publicación el 25 de septiembre de 2008.

PALABRAS CLAVE

VIH;
Epidemiología;
Lotes de sueros

Resumen

Introducción. En España no se conoce el número real de infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), al no existir un registro nacional. El objetivo de este estudio es estimar la prevalencia de infección por el VIH en la población atendida en un Servicio de Urgencias hospitalario (SUH) como indicador epidemiológico y de riesgo de exposición laboral durante la actividad asistencial, así como evaluar las diferencias observadas respecto a estimaciones previas.

Material y métodos. Se realizó un estudio transversal de todos los sueros recibidos por el SUH de forma anónima. El tamaño final de los lotes confeccionados fue de 5 sueros. La detección de anticuerpos del VIH se realizó mediante la técnica de ELFA de cuarta generación y la confirmación mediante western blot.

Resultados. De los 270 lotes confeccionados con los 1.347 sueros obtenidos, 7 lotes resultaron reactivos. El análisis individualizado de los sueros confirmó 6 sueros positivos y un suero falso positivo. La prevalencia observada fue del 0,52% (IC 95% 0,10-0,94). La caída en la prevalencia con respecto a los años 1990-1991 fue del 0,87%, aunque no resultó una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,08$).

Discusión. La aplicación del estudio de lotes de sueros en la detección de anticuerpos frente al VIH en muestras recogidas en los SUH permite evaluar la prevalencia de infección por este virus disminuyendo los costes con respecto al análisis individualizado de sueros, tanto en términos económicos como de manipulación de muestras.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: eiros@med.uva.es (J.M. Eiros Bouza).

KEYWORDS

HIV;
Epidemiology;
Pooled sera

HIV seroprevalence in the population treated in a hospital emergency department: analysis by pooled batches of serum

Abstract

Introduction. The current number of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infected people is not known in Spain as there is no national registry. This study has aimed to estimate the prevalence of HIV infection in the population treated in a hospital emergency department (ER) as an epidemic and risk of exposure indicator during healthcare activity and to assess the differences observed regarding previous estimates.

Material and methods. We conducted a cross-sectional study of all the sera received in the ER anonymously. The final size of the pools was 5 sera. HIV antibody screening was performed using the 4th generation ELFA technique and confirmation was performed by Western Blot.

Results. Seven out of the 270 pools made from 1,347 sera obtained were reactive. The individualized analysis confirmed 6 sera to be positive and 1 serum to be false positive. The observed prevalence was 0.52% (95% CI 0.10-0.94). Prevalence fell 0.87% in comparison to the years 1990-1991, although this was not statistically significant ($p = 0.08$).

Discussion. The implementation of HIV antibodies detection through a system of pooled batches in samples collected in the ER make it possible to assess the prevalence of infection with this virus, decreasing costs with regard to individualized analysis of sera in both economic terms as well as samples handling.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Al contrario de lo que ocurre en otros países de la Unión Europea, en España no existe un registro de ámbito nacional de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por lo que no es posible conocer el número real de infectados. En Castilla y León la infección por VIH ha sido incluida recientemente en el registro de enfermedades de declaración obligatoria de carácter nominal¹; sin embargo, es bien sabido que estos registros son adecuados en la detección de cambios en la epidemiología pero no tanto en la estimación de parámetros como la incidencia o la prevalencia.

En España, la verdadera prevalencia de la infección por el VIH es desconocida, y se efectúan aproximaciones a la misma para distintos grupos poblacionales y mediante diferentes metodologías. Durante muchos años dichas estimaciones se han hecho en grupos de población seleccionados clásicos como donantes y receptores de sangre o derivados sanguíneos. Otros grupos estudiados han sido aquellos con algún factor de riesgo como varones que realizan prácticas sexuales con varones² en los que la prevalencia de infección por el VIH era del 6,6% en 2002 y adictos a drogas por vía parenteral (ADVP)³ con cifras de prevalencia del 20,0% en el año 2004. Más recientemente se ha extendido a las mujeres embarazadas, obteniéndose una prevalencia del 0,2% en 2005⁴.

Hace años, nuestro grupo de trabajo publicó un método basado en el estudio de lotes de sueros con el objetivo de mejorar el coste-efectividad en el análisis de la prevalencia de la infección por el VIH en grupos de población donde la prevalencia esperada es baja o muy baja^{5,6}.

A partir de 1991 la infección por el VIH en España inició un descenso importante como revelan los datos del Centro Nacional de Epidemiología y la Secretaría del Plan Nacional sobre sida, basados en los diagnósticos hospitalarios de ca-

sa de sida y en los datos de los laboratorios y/o servicios clínicos de las comunidades autónomas representadas en el sistema de información sobre nuevas infecciones por VIH.

Sin embargo, desde la aparición de la terapia antirretrovírica de gran actividad (TARGA) la esperanza de vida de los pacientes infectados por el VIH o enfermos de sida ha experimentado un considerable aumento, y los individuos ya infectados sanos pueden contribuir a mantener una prevalencia de la infección a pesar de las medidas profilácticas sobre mecanismos de transmisión implementados en la última década.

El objetivo de este estudio es estimar la prevalencia de la infección por el VIH en la población atendida en un Servicio de Urgencias hospitalario (SUH) como indicador epidemiológico, así como de riesgo de exposición laboral durante la actividad asistencial. En segundo lugar, se pretende evaluar las diferencias observadas respecto a estimaciones previas.

Material y métodos

Se realizó un estudio de diseño transversal descriptivo, para el cual se obtuvieron de forma anónima todos los sueros recibidos por el Laboratorio del Servicio de Urgencias del Hospital Clínico Universitario de Valladolid para cualquier determinación, durante la semana del 12 al 18 de diciembre de 2005. El Hospital Clínico Universitario de Valladolid es un hospital de titularidad pública, perteneciente al Sistema de Salud de Castilla y León (SACYL), y atiende a una población total de 261.105 personas. El número de sueros incluidos en el estudio fue de 1.347.

Se empleó un método de estudio por lotes⁶, en el que se disminuye de forma sustancial el coste del estudio. Si analizamos una mezcla de sueros que denominamos lote, podemos asumir que, en determinadas circunstancias, la

negatividad del lote en la prueba supone la negatividad de todos y cada uno de los sueros integrantes, no siendo necesario realizar un análisis de cada uno de los sueros incluidos en él. El interés sobre estas estrategias ha aumentado con la aparición de la infección por el VIH, siendo recomendadas por la Organización Mundial de la Salud⁷. La validez de esta metodología dependerá siempre de las características de la prueba empleada. La mayoría de las técnicas diagnósticas utilizadas actualmente en serología son muy sensibles y, en general, permiten el uso de análisis de lotes.

Se calculó el tamaño de los lotes para una prevalencia esperada del 1%, dada la cual el tamaño óptimo de los lotes desde el punto de vista de coste-efectividad del análisis fue de 11 sueros de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$P_{\epsilon} = \frac{N}{m} (1+m(1-q^m))$$

Donde P_{ϵ} es el número de pruebas a realizar, N el número de sueros, m el tamaño del lote y q la probabilidad de ser negativo un suero, de tal manera que $1-q^m$ es la probabilidad de que un lote sea positivo. Siguiendo una estrategia conservadora, para una prevalencia estimada no superior al 5%, el tamaño final de los lotes confeccionados fue de 5 sueros.

Con el total de sueros recogidos se confeccionaron 269 lotes de cinco sueros cada uno y un lote de dos sueros, a razón de 200 μ l por suero, que fueron conservados a 4 °C hasta su procesamiento, que en ningún caso se demoró más de 24 horas. Asimismo, se conservaron alícuotas individualizadas de cada suero y de cada lote a -20 °C. Previamente al análisis de los lotes y sueros recogidos, se confeccionaron 4 lotes control positivo de cinco sueros (cuatro negativos y uno positivo) de acuerdo con el siguiente esquema: lote positivo estándar (4 sueros negativos y un suero control positivo del equipo del fabricante VIDAS®VIH DUO, Biomerieux); lote positivo alto (4 sueros negativos y un suero positivo de la rutina del laboratorio de virología, con un valor > 13 unidades relativas de fluorescencia [URF]); lote positivo medio (4 sueros negativos y un suero positivo con un valor entre 8 y 10 URF); lote falso positivo (4 sueros negativos y un suero falso positivo). Se incluyó también un lote negativo compuesto por 4 sueros negativos y un suero control negativo del equipo VIDAS DUO.

La detección de anticuerpos del VIH se realizó mediante la técnica de EIA/ELFA de cuarta generación (VIDAS®VIH DUO, Biomerieux). Es una prueba semiautomatizada que asocia dos reacciones inmunoenzimáticas con la detección final por fluorescencia de los anticuerpos anti-VIH-1 y anti-VIH-2, y la detección simultánea del antígeno p24. El valor de fluorescencia es proporcional a la presencia de anticuerpos anti-VIH-1 y anti-VIH-2 y/o Ag p24 presentes en la muestra. El cálculo del VRF o URF (valor relativo de fluorescencia o unidad relativa de fluorescencia) es el resultado de la diferencia entre una primera lectura que tiene en cuenta el ruido de fondo debido al sustrato y una segunda lectura después de la incubación del sustrato con la enzima. El sistema calcula automáticamente el valor de la prueba como sigue:

$$VP = \frac{VRF_{paciente}}{VRF_{estandar}}$$

Se considera ELFA positivo, según los criterios de positividad del fabricante, a cualquier valor de la prueba superior o igual a 0,25. Según los algoritmos diagnósticos adoptados en nuestro laboratorio, aquellos resultados del VRF superiores a 1 se consideran positivos continuándose el algoritmo diagnóstico, mientras que aquellos VRF inferiores a 1 suelen ser falsos positivos, lo que obliga a la reclamación de un nuevo suero para la comprobación⁸. Los lotes con reactividad evidente o en el límite umbral de la prueba se repitieron por la misma técnica.

Los sueros individuales pertenecientes a los lotes positivos se analizaron igualmente por la misma técnica de ELFA de cuarta generación. En los sueros individuales positivos se realizó confirmación mediante un western blot de VIH-1 (Biokit, IZASA) que posee péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2. Mediante esta técnica los anticuerpos específicos presentes en la muestra se unen a los antígenos del VIH-1 y VIH-2 adheridos a las tiras de nitrocelulosa, y se detectan mediante anticuerpos anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina tras añadir el sustrato BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y nitroazul de tetrazolo). Cada tira incluye un control interno de adición de la muestra para reducir al mínimo el riesgo de falsos negativos por errores operativos. La presencia o ausencia de anticuerpos frente al VIH en la muestra se determinó comparando cada tira de nitrocelulosa con las tiras de control del ensayo e identificando las bandas de reactividad correspondientes a los distintos antígenos del VIH. Los criterios de positividad del western blot fueron los propuestos por la Organización Mundial de la Salud⁹, con el siguiente esquema: positividad ante la existencia de dos bandas pertenecientes a alguna de las glucoproteínas codificadas por el gen *env* (gp 160, gp 120, gp 41) con o sin la presencia de bandas pertenecientes a proteínas codificadas por el gen *gag* (p55, p39, p24, p17) o *pol* (p66, p51, p31). La lectura de las bandas se realizó anotando la intensidad de cada una de ellas con la gradación 0, 1 ó 2, de menor a mayor intensidad.

Resultados

De los 270 lotes (269 lotes de cinco sueros y uno de dos) 7 resultaron reactivos en primera determinación para el ELFA de cuarta generación, con reactividades que oscilaron en valores de fluorescencia relativa desde 183 a 11.404 UFR, siendo la mediana de 10.776 UFR. Posteriormente se confirmaron en una segunda determinación mediante la misma técnica obteniendo reactividades similares. El análisis individualizado de cada uno de los sueros integrantes de los lotes permitió confirmar 6 sueros como positivos y 1 suero como falso positivo en el ELFA de cuarta generación (tabla 1) siendo negativos los restantes 28 sueros de los lotes reactivos. En un lote positivo para el ELFA de cuarta generación no se encontró ningún suero positivo. En todos los sueros positivos se observaron reactividades superiores a 20 (valor de la prueba) excepto en uno donde se detectó un valor límite de la prueba cercano al límite.

De los 7 sueros reactivos para el ELFA, 6 se confirmaron por western blot y uno resultó indeterminado. Además de la presencia de dos glucoproteínas *env* en todos los sueros positivos, se observaron reactividades frente a otras proteínas

TABLA 1 Reactividades de lotes y sueros individuales por ELFA de cuarta generación observadas en sueros de Urgencias

Lotes y sueros individuales reactivos	Anticuerpos VIH ELFA 4 ^a Primera determinación		Anticuerpos VIH ELFA 4 ^a Segunda determinación	
	VRF	Valor test	VRF	Valor test
L5	183	0,44	170	0,46
L30	11.155	27,20	10.369	28,48
S5	10.995	30,20		
L68	11.404	27,81	10.998	30,21
S2	11.600	31,86		
L72	9.448	23,04	8.424	23,14
S4	8.773	24,10		
L79	10.776	26,28	10.220	28,07
S1	98	0,26		
S2	10.743	29,51		
L92	11.144	27,18	10.328	28,37
S4	10.527	28,92		
L126	10.635	25,93	9.722	26,7
S2	10.410	28,59		

L: lote; S: suero individual; VRF: valor relativo de fluorescencia.

codificadas por los genes *pol* y *gag*, como muestra la tabla 2. Un suero resultó indeterminado al detectarse únicamente una banda con intensidad grado 1 para la glucoproteína *env* 160.

El objetivo del estudio realizado por nuestro grupo de trabajo en 1990-1991 fue conocer la frecuencia de seropositividad para el VIH en sueros de pacientes atendidos en el Servicio de Urgencias del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y se realizó de forma análoga a la descrita para el presente trabajo⁵. En dicho estudio la prevalencia observada fue del 1,38% (intervalo de confianza [IC] del 95% 0,43-2,33).

Los datos obtenidos en el presente análisis, 7 sueros positivos sobre un total de 1.347 sueros analizados, suponen una prevalencia observada del 0,52% (IC 95% 0,10-0,94). La caída en la prevalencia con respecto a los años 1990-1991 fue del 0,87%, sin embargo la diferencia entre las prevalencias no resultó estadísticamente significativa (test exacto de Fisher bilateral: $p = 0,08$).

El análisis individualizado de los sueros recogidos habría supuesto un total de 1.354 determinaciones para ELFA de cuarta generación y 7 para el western blot. Se ha podido documentar con la estrategia de lotes un ahorro de reactivos del 79% del estimado en un análisis individualizado de sueros.

Discusión

Los SUH son una vía muy importante y no discriminada de acceso al Sistema Sanitario (SS) por parte de los usuarios,

lo cual convierte a los SUH en una herramienta útil en la monitorización de los problemas de salud presente en una población determinada. Si bien la población representada en nuestro estudio son principalmente usuarios del SS público, éste supone una cobertura de más del 95% según los datos aportados por SACYL en relación con el Padrón Municipal de Castilla y León. Entre las pruebas complementarias más frecuentemente demandadas y empleadas para el diagnóstico de pacientes que acuden a Urgencias se encuentra la analítica sanguínea. Por ello, la determinación de anticuerpos frente a virus como el VIH en los sueros obtenidos en el laboratorio de los SUH se ha mostrado de utilidad en la evaluación de la prevalencia de estas enfermedades¹⁰.

Más allá de este hecho, la manipulación de las muestras de sangre-suero por parte del personal asistencial constituye un riesgo de exposición ocupacional a enfermedades infecciosas de transmisión parenteral. Al inicio de la epidemia de VIH-sida existió una grave preocupación por los riesgos que podrían entrañar el manejo y los accidentes ocasionados con este tipo de muestras, lo cual hizo que se desarrollaran y mejoraran las denominadas precauciones universales. Los anteriores trabajos en evaluación de la prevalencia del VIH fueron llevados a cabo cuando la epidemia del VIH estaba alcanzando sus valores máximos y la percepción de riesgo era mayor de lo que es actualmente. La tasa de exposición por 100 trabajadores-año es ascendente, salvo en MIR y técnicos de laboratorio¹¹.

La aplicación del estudio de lotes de sueros en la detección de anticuerpos frente al virus del VIH en muestras recogidas en SUH permite realizar una evaluación de la prevalencia de infección por este virus, disminuyendo los costes con respecto al análisis individualizado de sueros, tanto en términos económicos como de manipulación de muestras. Este hecho es especialmente llamativo cuando la prevalencia esperada de la enfermedad es baja. Este tipo de análisis se ha realizado bajo el supuesto de una sensibilidad del 100% en el test, avalado por los controles realizados, así como las experiencias previas de nuestro grupo de trabajo⁶. En cualquier caso, una sensibilidad real por debajo del 100% conllevaría una infraestimación de la prevalencia, mientras el valor hallado de la misma es superior a lo que cabría esperar.

En España entre 1990 y 2005 se ha producido un descenso significativo en la prevalencia de infección por el VIH para grupos de población de riesgo clásicos, y fundamentalmente en ADVP. Sin embargo, este estudio revela que el descenso no alcanza la magnitud que cabría esperarse en la población general. Diferentes observaciones (Plan Nacional del Sida) y registros han puesto de manifiesto el aumento de casos de sida ligados a transmisión heterosexual, que en muchos casos son casos de retraso diagnóstico y enmascaran la prevalencia real de la infección por el VIH. En consecuencia, es razonable pensar que la epidemia del VIH se está desplazando hacia otros ámbitos de población cuyas características deberán ser definidas en sucesivas investigaciones con el fin de identificar grupos diana en la prevención de dicha epidemia. La realización periódica de encuestas como la realizada en el presente estudio ayudará de forma real y coste-eficaz a la monitorización de la prevalencia.

TABLA 2 Reactividad de sueros individuales por western blot

Sueros (lotes) reactivos	Reactividad por WB									Interpretación
	gp160	120	41	p66	51	31	p55	24	17	
S5 (L30)	2	1	0	0	0	0	0	2	0	Positivo
S2 (L68)	2	2	2	1	1	2	1	2	1	Positivo
S4 (L72)	2	2	1	2	1	1	1	1	0	Positivo
S1 (L79)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Indeterminado
S2 (L79)	2	2	1	1	0	2	1	2	2	Positivo
S4 (L92)	2	2	2	2	0	2	1	2	0	Positivo
S2 (L126)	2	2	2	2	1	2	2	2	1	Positivo

L: lote; gp: glucoproteína; p: proteína; S: suero; WB: western blot.

0: no reactividad; 1: reactividad débil o moderada; 2: reactividad fuerte.

Bibliografía

1. ORDEN SAN/2128/2006, de 27 de diciembre, por la que se regula el Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria de Castilla y León. Boletín Oficial de Castilla y León nº 5 del día 8 de enero de 2007.
2. Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, Secretaría del Plan Nacional sobre SIDA, editores. Evolución de la prevalencia de VIH en pacientes de once centros de enfermedades de transmisión sexual y/o de diagnóstico del VIH, 1991-2004. Madrid; 2005.
3. Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, Secretaría del Plan Nacional sobre SIDA, editores. Estudio anónimo no relacionado de la seroprevalencia de VIH en pacientes de consultas de enfermedades de transmisión sexual. 1998-2002. Madrid; 2003.
4. Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, Secretaría del Plan Nacional sobre SIDA, editores. Estudio anónimo y no relacionado sobre prevalencia de anticuerpos anti-VIH 1 y 2 en recién nacidos de 8 Comunidades Autónomas, 1996-2005. Madrid; 2006.
5. Ortiz de Lejarazu R, Eiros JM, Almaraz A, Castrodeza J, Martín FJ, Rodríguez Torres A. Anticuerpos VIH en un servicio de Urgencias hospitalario. Detección mediante sistema de lotes. *Rev Clin Esp.* 1992;191:468-72.
6. Martín FJ, Eiros JM, Orduña A, Ortiz de Lejarazu R, Almaraz A, Rodríguez Torres A. Estrategias óptimas para estudios por lotes. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1995;13:176-9.
7. World Health Organization. Testing for HIV antibody in serum pools. *Bull World Health Organ.* 1992;70:277-81.
8. Delgado Vázquez R, García García F, Eiros Bouza JM, López Bernaldo de Quirós JC, Ortiz de Lejarazu R. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 2ª ed. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2006.
9. World Health Organization. Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). Proposed criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2 and HTLV-I/HTLV-II. *Wkly Epid Rec.* 1990;65:281-3.
10. Raboud JM, Sherlock C, Schechter MT, Lepine DG, O'Shaughnessy MV. Combining pooling and alternative algorithms in seroprevalence studies. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2298-302.
11. Hernández Navarrete MJ, Misiego Peral A, Arribas Llorente JL. Exposiciones a riesgo biológico. EPINETAC 1996-2002. Estudio global. En: Campins Martí M, Hernández Navarrete MJ, Arribas Llorente JL, editores. *Estudio y seguimiento del riesgo biológico en el personal sanitario.* Madrid: Grupo de Trabajo EPINETAC; 2005. p. 53-144.