

Análisis numérico de imágenes digitalizadas de western blot. El caso del VIH

Carlos Larralde,* Erika Paz,* Mónica Viveros,[^] Alejandro Padilla,* Carmen Soler*,**
y Tzipe Govezensky*

Resumen

El presente trabajo explora la digitalización de imágenes de "western blot" (WB) para extraer mayor información acerca de la respuesta inmune humoral del paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (VIH) y analizar de manera multivariada los datos obtenidos.

Se realizó la digitalización y análisis de las imágenes de WB de 115 sueros. Con estos datos se hicieron análisis tanto cualitativo: dendograma y análisis de componentes principales (ACP), como cuantitativos: ACP con el total de bandas tomando sólo los antígenos propios del virus o utilizando los antígenos que no pertenecen al virus.

Los resultados demuestran la factibilidad de diagnosticar de forma mecánica un número grande de imágenes de WB. Tanto el dendograma como el ACP cualitativo separaron, de manera adecuada, imágenes blancas, imágenes con menos de cuatro bandas e imágenes con patrones más complejos. El análisis cuantitativo, que conserva más información, separa perfectamente imágenes de diagnóstico negativo, indeterminado y positivo. Además, se encontró que las imágenes con patrones complejos correlacionan más con individuos asintomáticos. Este análisis reveló también la existencia de bandas que no parecen corresponder a proteínas virales, mismas que pudieran corresponder a autoantígenos o antígenos cruzados entre el VIH y el ser humano, dando cauce a autoinmunidad.

El análisis digital de imágenes de WB en el caso del VIH, prueba así su gran utilidad en el diagnóstico de caso y en el seguimiento de la evolución y patogenicidad de la enfermedad.

Palabras clave: Western blot, serología VIH, imagenología

Summary

The present work explores the use of image digitalization of western blot (WB) aiming to extract more information about the humoral immune response of human immunodeficiency virus (HIV) infected individuals, and to analyze obtained data in a multivariate manner.

The digitalization and analysis of WB images was performed on 115 sera. Images were analyzed either qualitatively: dendrogram and principal component analysis (PCA) or quantitatively: PCA of the total bands, taking either the antigens, which belong to the virus, or only those which do not.

Results show the feasibility of mechanical diagnosis of a large number of WB images. The dendrogram and the qualitative PCA satisfactorily separated white images, images with less than four bands, and images with more complex patterns. Quantitative analysis, which keeps more information separated the images of negative, undetermined and positive diagnosis quite precisely. It was also found that the positive images with complex patterns of antigen recognition correlate better with asymptomatic individuals. Image analysis also revealed various other bands in WB which do not seem to correspond to viral proteins and could represent autoantigens or crossed antigens between HIV and humans which may cause autoimmunity.

Digital analysis of WB images is thus demonstrated to be of great usefulness in the diagnosis and of potential great interest in following the evolution and exploring the pathogenesis of AIDS.

Key words: Western blot, HIV serology, image analysis

* Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

** Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Carlos Larralde. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México D.F., C.P. 04510, México. Fax: (525)5500048.

Introducción

El inmunodiagnóstico de la infección por VIH es sumamente importante, pues establece el diagnóstico de caso de infección y podría ser el único método costeable para sostener una vigilancia epidemiológica masiva y confiable en cuanto a su sensibilidad y especificidad.

El WB es la prueba inmunológica confirmatoria de infección por VIH¹⁻⁴ y aunque provee una señal rica y relativamente fácil de interpretar visualmente con respecto a la positividad, no deja de recurrir a la "experiencia" del intérprete. Además, la inspección visual del WB soslaya aspectos notorios de la imagen, perdiéndose así mucha información útil en el seguimiento fino del curso de la enfermedad^{3,5-8} y para la investigación.

El presente trabajo propone una metodología imagenológica y estadística original para analizar todo el conjunto de bandas de WB en cada caso de infección (y no bandas por separado o sólo alguna combinación de éstas) que además de proporcionar el diagnóstico lo correlaciona con el estado clínico de la enfermedad y sugiere caminos de investigación, todo esto ilustrado para el caso del VIH, pero potencialmente aplicable a cualquier otra enfermedad con mediación inmunológica.

Material y métodos

Sueros

Se utilizaron 115 sueros (92 VIH positivos, 18 VIH negativos y 5 indeterminados) proporcionados por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE).

Los sueros se probaron en WB comercial de Du Pont, que es la única prueba autorizada por la Food and Drug Administration, utilizando el siguiente procedimiento: se agrega a cada tira de nitrocelulosa 2 ml de solución amortiguadora salina con fosfatos pH 7.2 y 0.3% de Tween 20 (PBS-Tween 0.3%); se incuba 30 minutos a temperatura ambiente en agitación; se remueve por aspiración; se agrega a cada tira 2 ml PBS-Tween 0.3%; se incuba 5-10 min en agitación y se agrega 20 µl suero; se obtiene así una dilución final de 0 1:100; se incubata toda la noche a temperatura ambiente en

agitación; se remueve por aspiración a un recipiente con hipoclorito de sodio (6%); se lava 3 veces con 3 ml PBS-Tween 0.3%, 5 min cada vez; se agrega 2 ml de Proteína A-biotinilada (en PBS-Tween 0.3%) dilución 1:400; se incuba durante 60 min a temperatura ambiente en agitación; se lava una vez con 3 ml PBS-Tween 0.3% 5 min y 2 veces con 3 ml PBS, 5 min cada vez; se agrega 2 ml de estreptoavidina peroxidasa dilución 1:400; se incuba 10 a 15 min en agitación; se aspira el sustrato y se detiene la reacción enjuagando varias veces con H₂O bidestilada.

Digitalización y análisis de WB

Lastiras de nitrocelulosa obtenidas en la prueba de WB se analizaron a través de un digitalizador de imágenes, usando el equipo AMBIS OIS.⁹ El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. Digitalización de los WB en grupos de 20-30 individuos.
2. Separación por individuo agregando una breve descripción que incluye el número control del suero.
3. Eliminación del fondo, por medio de una sustracción lineal de una recta vertical tangente al valle más bajo.
4. Ajuste del tamaño de los WB en pantalla, para quedar todas las imágenes exactamente del mismo tamaño eliminando así la diferencia entre ensayos.
5. Establecer el diagnóstico serológico de cada imagen. Para diagnosticar si un WB es positivo, negativo o indeterminado existen varios criterios. En este estudio se aplicaron dos criterios: a) el criterio de Du Pont, casa comercial de los WB utilizados en el estudio, y b) el criterio del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (INDRE), centro de referencia de diagnóstico de SIDA en México, que usa el criterio de la Organización Mundial de la Salud. Para definir si una banda está presente, el criterio de Du Pont establece cierta reactividad del complejo antígeno-anticuerpo formado o banda (la reactividad debe de ser por lo menos como la de la p24 en el control débilmente reactivo), mientras que para

el diagnóstico del INDRE basta con detectar visualmente su presencia. El asignar el diagnóstico correspondiente a cada WB, generalmente se hace a ojo, lo que resulta subjetivo, sobre todo para criterios como el de Du Ponten el que el diagnóstico positivo requiere que las bandas cumplan con cierta intensidad. Tener la imagen digitalizada permite asignar un valor numérico de corte de intensidad que constituye un criterio objetivo y equitativo para resolver si la banda está o no presente.

6. Revisión de las imágenes para elaborar un Patrón Global que incluya todas las bandas reconocidas por todos los sueros en cuestión.
7. Cuantificación, con ayuda del Patrón Global de bandas, se cuantifica la intensidad de cada banda de cada suero (la cuantificación de cada banda o pico representado en el histograma es el área bajo la curva).
8. Con la información de la cuantificación de cada banda se crea una matriz de datos cuantitativos. Se establece un valor de corte por encima del cual se considera que existe una banda y por debajo del cual no hay banda, obteniéndose así otra matriz con datos cualitativos.

Análisis

Los datos de cuantificación obtenidos con el paquete Ambis OIS, se analizan con la ayuda del paquete estadístico CSS¹⁰ que opera en cualquier computadora personal (386 en adelante) con coprocesador matemático, para obtener: 1. Dendrograma usando datos cualitativos. El índice utilizado para este análisis fue el coeficiente de agrupamiento simple y el algoritmo de liga simple¹²; $(a + d)/(a + b + c + d)$, en donde: a representa el número de características que ambos individuos en cuestión poseen; b representa el número de características que tiene el individuo 1 pero el individuo 2 no tiene; c representa el número de características que tiene el individuo 2 pero el individuo 1 no tiene; d representa el número de características de los que ambos individuos en cuestión carecen; la suma $a + b + c + d$ es igual al total de variables medidas. 2. Análisis de componentes principales (ACP) con datos cualitativos. 3. ACP con datos cuantitativos con: a) el patrón antigénico completo; b) los antígenos

propios del VIH; c) los antígenos no propios del VIH. El ACP es un análisis exploratorio que se aplica a conjuntos de datos con p-variables.¹¹⁻¹⁴ Debido a la imposibilidad de graficar en p-dimensiones, este análisis busca encontrar la proyección de los datos en un plano en el que se aprecie la máxima dispersión de éstos. Es decir, se trata de encontrar primero la dirección de mayor dispersión y colocar en esta dirección un primer eje al que se le llama primera componente principal; el segundo eje o segunda componente principal se coloca perpendicular al primero en la dirección de mayor dispersión después de la señalada con la primera componente. Los eigenvalores y eigenvectores se calculan por una definición matemática y son propios o característicos de cada matriz. En el ACP, los eigenvalores son proporcionales a la varianza (dispersión) reflejada por cada componente principal. Los eigenvectores, en este caso, son el conjunto de coeficientes por los que se multiplica a cada una de las variables originales para obtener los nuevos ejes (componentes); de aquí que el analizar cada vector indica la importancia que asigna a cada variable este tipo de transformación.¹²

Resultados

Las tiras de nitrocelulosa que se obtienen como resultado en la prueba de WB presentan bandas que con el tiempo y al contacto continuo con la luz, van perdiendo intensidad. Este problema queda resuelto con la digitalización, pues la información de la imagen queda capturada y no sufre cambio alguno (Figura 1).

Al hacer la separación por individuo, el programa de Ambis OIS crea un histograma en el cual cada pico representa una banda y su intensidad. En el histograma correspondiente a cada individuo, se elimina el fondo (Figura 2) de una manera lineal para disminuir por igual la intensidad de todas las bandas del WB. Tratando a todas las imágenes por igual se obtuvo un Patrón Global con un total de 20 bandas, 11 de las cuales coinciden con las señaladas por el manual de Du Pont como antígenos del virus (en la región de gp41 se distinguieron 3 bandas) y 9 bandas que no son propiamente del VIH; En la figura 3 se muestran algunos WB que

ejemplifican la presenciadiferencial de los 20 antígenos en la población estudiada. En la figura 4 se muestran los pesos moleculares correspondientes a cada antígeno y ejemplos del resultado de la cuantificación; obsérvese que la cuantificación refleja tanto la intensidad como el área de cada banda. Al no haber banda se obtiene un valor de cero, o un valor bajo de intensidad.

El dendograma cualitativo (Figura 5) presenta dos ramas principales. Las tiras de WB que se encuentran en la parte superior del dendograma son negativas y conforme se avanza hacia abajo van apareciendo WB con 1 o 2 bandas, hasta adquirir un patrón muy completo y con bandas muy reactivas en la parte central del dendograma. En la parte inferior se encuentran WB que no presentan un patrón uniforme pues varios WB reconocen pocas bandas y algunos tienen un patrón muy completo. En el dendograma se señalan dos cortes: A y B. Tomando el corte A encontramos que: a)

para el diagnóstico de Du Pont, en el grupo 1A se encuentran todos los individuos negativos y en el grupo 2A se encuentran todos los positivos, habiendo individuos indeterminados en ambos grupos; b) usando el diagnóstico del INDRE el grupo 2A está compuesto exclusivamente por individuos positivos, en el grupo 1A se encuentran todos los negativos, 5 indeterminados y 2 positivos (ambos tienen únicamente dos bandas). Tratando de estudiar con más detalle los WB positivos, se tomó como línea de corte la marcada como B. Bajo este corte se encuentran varios grupos, a los que clasificamos como: 1B, 2B, 3B y 4B. En el grupo 1B, que corresponde al grupo 1A, se encuentran individuos que reconocen de 0-4 bandas, que a excepción de una, pertenecen al virus. En el grupo 2B se encuentran individuos que reconocen de 7-14 bandas, en donde 4 de las bandas reconocidas no pertenecen a los antígenos del virus y, aunque con diferentes frecuencias, ya son reconocidos todos los antígenos

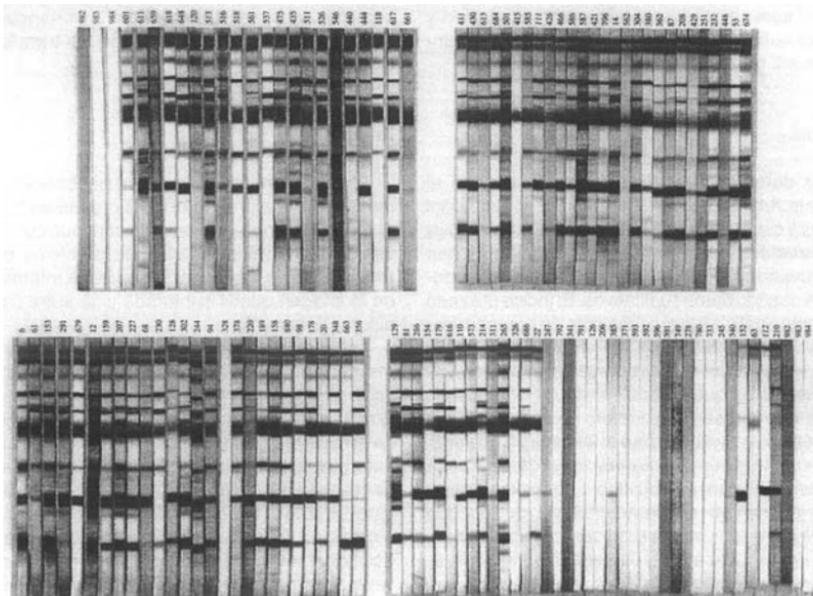


Figura 1. imagen digitalizada de los 115 WB analizados en este estudio.

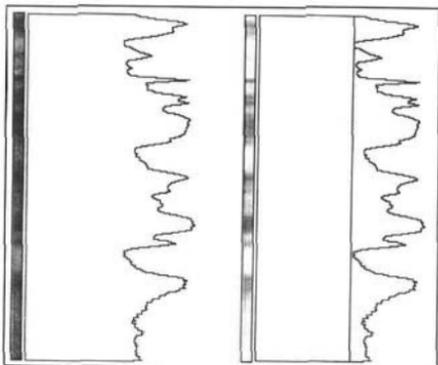


Figura 2. Eliminación del ruido de fondo. Izquierda: imagen original; derecha: imagen obtenida al restar el fondo.

nos del VIH. En el grupo 36 se encuentran individuos que reconocen de 15-20 bandas, en donde casi todos los individuos reconocen a todas las bandas del virus. Los individuos de este grupo no sólo tienen un patrón muy completo sino que también son altamente reactivos, tanto para las bandas propias del virus como para los otros antígenos. En el grupo 4B se encuentran individuos que reconocen de 4-17 bandas, también en este grupo se encuentran las 20 bandas del patrón, pero en general reconocidas con menor frecuencia que en el grupo 36 (Cuadro I).

Con los mismos datos con los que se hizo el dendograma (datos cualitativos), se hizo también un análisis de componentes principales (ACP).¹¹ Los eigenvalores del análisis son proporcionales a la varianza explicada por cada componente. Usando las dos primeras componentes se explica un 69% de la varianza. Los eigenvectores muestran la importancia o "peso" de cada banda; para este caso apenas se observa una pequeña diferencia entre estos valores, esto es, los 20 antígenos tienen la misma importancia en este análisis. En la figura 6 se presenta el resultado del ACP cualitativo al clasificar a los individuos según el diagnóstico de Du Pont (superior) y del INDRE (inferior). Se observa un grupo arriba a la izquierda (grupo I) separado del resto de los individuos (grupo II). Para el criterio

de Du Pont los negativos quedan casi todos sobrepuestos en un solo punto (N) y los demás individuos del grupo I son o negativos o indeterminados y en el grupo II hay numerosos sueros indeterminados. Para el criterio del INDRE en el grupo I se encuentran todos los individuos negativos, los cinco indeterminados y en el extremo inferior 2 individuos positivos. En el grupo II se encuentran únicamente individuos positivos.

Analizando con más detalle, se formaron los grupos que se muestran en la figura 7A. El cuadro II muestra la frecuencia de reconocimiento para cada banda en los grupos marcados (1 a 6). En ella se observa que conforme se avanza del grupo 1 al

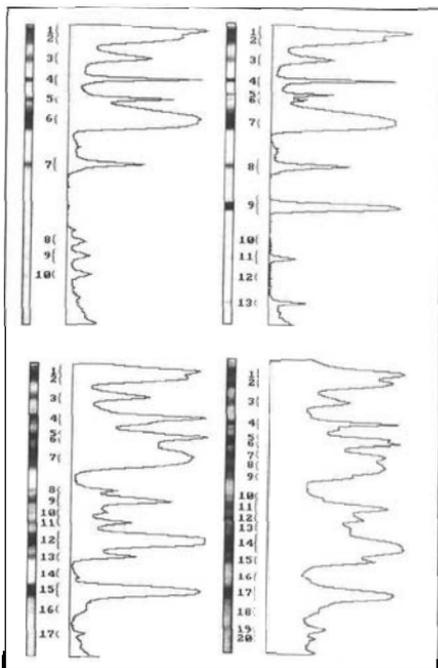


Figura 3. Obtención del patrón global de 20 bandas. Los números que aparecen en la figura los asigna el paquete utilizado para identificar cada pico seleccionado. Al incorporar un nuevo pico, los números se reordenan automáticamente.

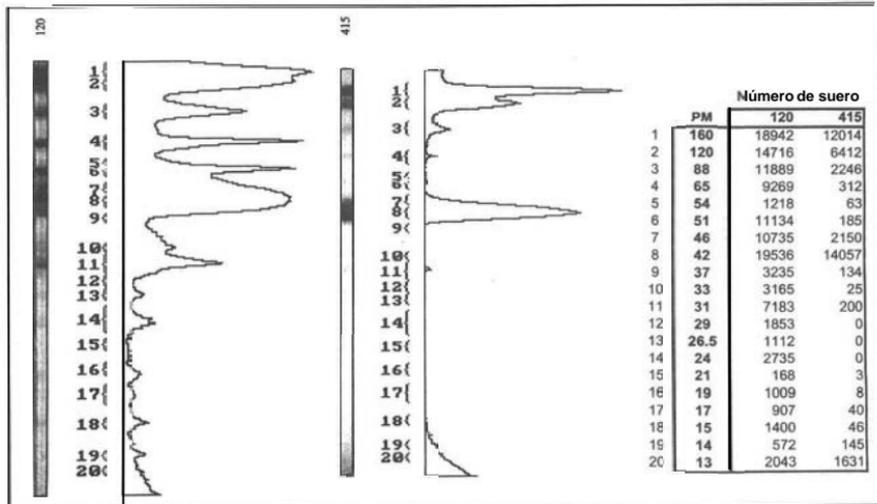


Figura 4. Ejemplo de cuantificación. Sueros 120 y 415. En la tabla la primera columna es el número asignado a cada pico; la segunda columna muestra el peso molecular (PM) en kilodaltones que le corresponde a cada uno; las columnas tercera y cuarta muestran el área bajo la curva del histograma calculada para cada pico.

6, dichas frecuencias van aumentando para cualquiera de los 20 antígenos. En los grupos 2 y 3 las bandas que no pertenecen al virus casi no son reconocidas y las bandas del virus son reveladas, pero no por todos los individuos; a partir del grupo 4 todas las bandas del virus son reconocidas por la mayoría de los individuos; en los grupos 5 y 6 se presentan todas las bandas en diferentes frecuencias.

Se realizó también un ACP con los datos cuantitativos, analizándose entonces la intensidad de cada banda del patrón total para cada individuo. En este ACP se explica el 80% de la varianza con las dos primeras componentes principales. Teniendo en el Patrón Global 11 bandas pertenecientes a los antígenos del virus interés o si son éstas las que mayormente pesan en el análisis. Enumerando las 11 bandas con mayor peso, encontramos que nueve de éstas pertenecen al virus [las correspondientes a los PM 54 y 37 kD (esta última subdivisión de la gp41) que pertenecen al virus no se encuentran] y 2 que no son propias del VIH correspondientes a los PM 88 y 29 kD. El ACP obtenido con datos

cuantitativos muestra dos grupos separados: uno muy compacto que corresponde a imágenes con muy pocas bandas (de cero a dos) y otro disperso que corresponde a toda la gama de patrones obtenidos, tal como se muestra en la figura 8. La figura 9 muestra los resultados clasificando a los individuos con el criterio de Du Pont (A) y del INDRE (B) que, aunque varían en aquéllos diagnosticados como indeterminados, éstos se encuentran en zonas definidas. Con respecto al diagnóstico de Du Pont se encontró que los WB negativos, agrupados casi en un punto, se separan perfectamente del resto de los WB (zona A). Siguiendo hacia la derecha existe un área de individuos indeterminados (zona B), y en la zona C están los positivos. Existen 2 zonas limítrofes angostas (zonas D y E) en las que la separación no es tan clara. Con respecto al diagnóstico del INDRE el grupo compacto está formado por todos los individuos negativos y los cinco indeterminados, en tanto que todos los individuos positivos quedan perfectamente separados.

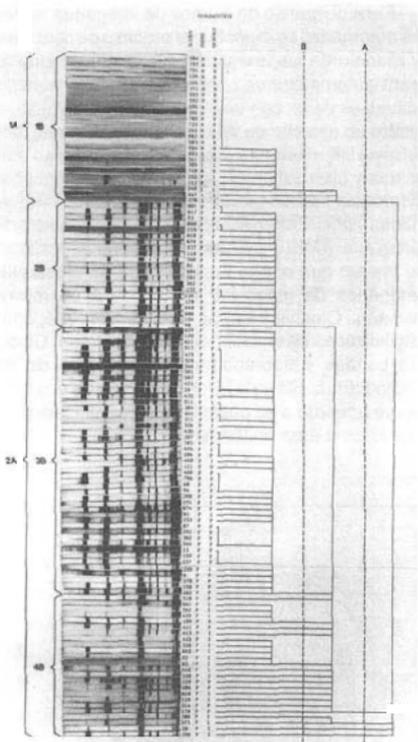


Figura 5 Agrupación de patrones de acuerdo al dendrograma. Para cada tira de WB se muestra su número de suero y su diagnóstico de acuerdo al criterio de INDRE, así como para el criterio de Du Pont. P = Positivo; I = Indeterminado; N = Negativo.

Correlación de imágenes con datos clínicos

Clasificando a los individuos en asintomáticos (A) o con algún síntoma (S) (pérdida de peso, dolor de cabeza, candidiasis, etc.) y colocándolos en el ACP cuantitativo obtenido (Figura 8) se obtuvo, la

Cuadro I. Frecuencia de reconocimiento de cada antígeno dentro de cada grupo del dendrograma

PM	1B	Grupo 2B	3B	4B
*160	0.20	1.00	1.00	1.00
*120	0.08	1.00	1.00	1.00
88	0.00	0.81	1.00	0.75
*65	0.04	1.00	1.00	0.79
*54	0.00	0.38	1.00	0.29
*51	0.04	1.00	0.98	0.63
*46	0.04	0.95	1.00	0.96
*42	0.08	1.00	1.00	1.00
*37	0.00	0.38	1.00	0.42
33	0.00	0.05	0.60	0.21
*31	0.00	0.86	1.00	0.67
29	0.00	0.33	1.00	0.42
26.5	0.00	0.00	0.62	0.21
*24	0.20	0.90	0.98	0.75
21	0.00	0.00	0.76	0.29
19	0.08	0.00	0.80	0.25
*17	0.04	0.71	0.98	0.79
15	0.00	0.00	0.98	0.42
14	0.00	0.00	0.73	0.29
13	0.00	0.19	0.76	0.50

Individuos en el grupo

Número de bandas

Frecuencia = Número de individuos cuyo suero reacciona con determinada banda, dividido entre el total de individuos pertenecientes a cada grupo. Los antígenos marcados con asterisco corresponden a los antígenos propios del VIH.

distribución de la figura 10. No encontrándose agrupaciones visualmente claras de pacientes, se dividió el plano en cuatro cuadrantes iguales y se calcularon los porcentajes de asintomáticos y sintomáticos colocados en la misma figura. Un análisis de regresión logarítmica¹⁵ reveló que la interacción cuadrante-síntoma es significativa; es decir, el número de asintomáticos cambia de acuerdo al cuadrante, habiendo más asintomáticos en los cuadrantes, II y IV que corresponden a las imágenes más complejas.

Discusión

La digitalización de imágenes permitió sistematizar con cierta facilidad los resultados obtenidos en los WB, conservándose de esta manera intactas las imágenes, pudiéndose cuantificar y crear archivos de datos disponibles para diversos estudios. Esto es de particular interés en el caso del SIDA, pues el WB es la prueba inmunológica confirmatoria para el diagnóstico de caso, y una vez hecho el diagnóstico la información detallada no se aprovecha para estudios de la respuesta inmune humoral en el desarrollo en la enfermedad individual o colectivamente. El interés principal de este trabajo es recuperar dicha información y proponer procedimientos para su análisis.

Cuadro II. Frecuencia de reconocimiento de cada antígeno dentro de cada grupo del ACP con datos cualitativos

PM	Grupo					
	1	2	3	4	5	6
*160	0.00	0.56	1.00	1.00	1.00	1.00
*120	0.00	0.22	1.00	1.00	1.00	1.00
88	0.00	0.00	0.38	0.88	1.00	0.96
*65	0.00	0.11	0.50	0.96	1.00	1.00
*54	0.00	0.00	0.13	0.33	0.40	0.98
*51	0.00	0.11	0.25	0.92	0.90	0.98
*46	0.00	0.11	0.75	1.00	1.00	1.00
*42	0.00	0.22	1.00	1.00	1.00	1.00
*37	0.00	0.00	0.00	0.42	0.80	0.94
33	0.00	0.00	0.00	0.04	0.40	0.58
31	0.00	0.00	0.25	0.92	0.80	0.98
29	0.00	0.00	0.00	0.33	0.70	0.98
26.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.63
*24	0.00	0.56	0.25	0.92	1.00	0.98
21	0.00	0.00	0.00	0.04	0.30	0.77
19	0.00	0.22	0.00	0.04	0.30	0.79
*17	0.00	0.11	0.50	0.71	1.00	0.98
15	0.00	0.00	0.00	0.04	0.60	0.98
14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.77
13	0.00	0.00	0.13	0.17	0.70	0.79

Individuos en el grupo
Número de bandas

16	9	8	24	10	48
0-0	1-4	4-8	8-14	12-16	16-20

Frecuencia = Número de individuos cuyo suero reacciona con determinada banda dividido entre el total de individuos pertenecientes a cada grupo. Los antígenos marcados con asterisco corresponden a los antígenos del VIH.

Para el manejo de cientos de imágenes de WB se automatizó en lo posible el proceso de captación y manejo de las imágenes. Un punto importante para automatizar es contar con un buen material visual, es decir, con un buen WB. En este caso se utilizó un estuche de WB comercial (Du Pont), con resultados altamente reproducibles, bandas muy claras y bien definidas. Aún así existen pequeñas diferencias en los tamaños de las tiras de nitrocelulosa y por lo tanto en la posición de las bandas. El programa AMBIS OIS permite mejorar este aspecto puesto que ofrece la posibilidad de ajustar las imágenes de todos los individuos a un mismo tamaño. Otra ventaja de trabajar con imágenes digitalizadas es el poder elaborar un Patrón Global de bandas y superponerlo a cada uno de los individuos, facilitando la identificación de una banda de acuerdo a su posición y la cuantificación de una misma área en todos los casos.

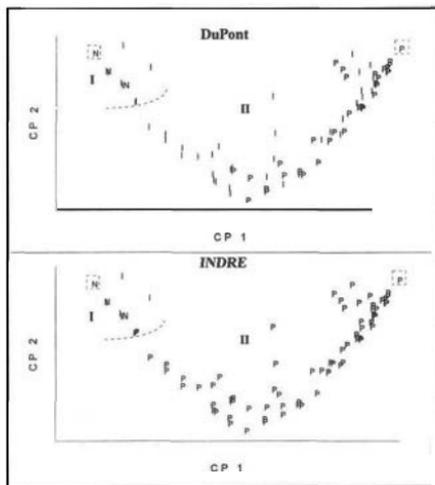


Figura 6. ACP con datos cualitativos, substituyendolos puntos obtenidos por el diagnóstico según: gráfica superior) el criterio de Du Pont; gráfica inferior) el criterio del INDRE. P = Positivo; I = Indeterminado; N = Negativo. □ representa 16 sueros diagnosticados como negativos; ■ representa 8 sueros diagnosticados como positivos. CP1 Componente principal 1; CP2 Componente principal 2 (en ambos ejes unidades relativas).

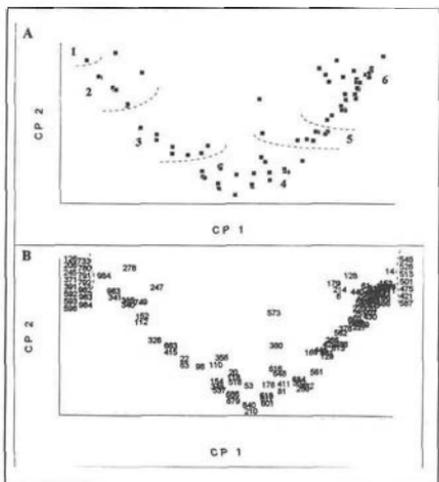


Figura 7. ACP con datos cualitativos. A) Formación de grupos; B) Los números en la gráfica corresponden al número de suero representado por el punto. CP1 Componente principal 1; CP2 Componente principal 2 (en ambos ejes unidades relativas).

Es conveniente resaltar que el primer paso para automatizar cualquier procedimiento es fijar una serie de parámetros que requieren de un estudio previo del material en cuestión; el valor óptimo de estos parámetros conducirá a resultados confiables, con un mínimo de decisiones erróneas. La regla utilizada para eliminar el fondo del histograma fue restar de todos los puntos el valor del valle mínimo. En la mayoría de los casos este valor fue cero, es decir no se restó fondo y por lo tanto no se alteró en absoluto la imagen inicial. En los casos en que el fondo fue pequeño tampoco se alteró la información; sólo se observaron dos casos en los que se restó un valor muy alto. Al digitalizar la imagen se pasa de una información visual a una información numérica de posición y cantidad que queda representada por el histograma. La percepción visual registra la intensidad y el grosor de determinada banda, y es sólo con la ayuda de la computadora que se puede efectuar la sumatoria (área bajo la curva) para dar como resultado la cantidad de esa banda; a partir de este dato se

estableció un umbral arbitrario por encima del cual se consideró si existe o no una banda en cada WB.

El analizar los resultados del WB resulta complicado puesto que se trata de información multivariada; por lo general se analiza cada banda por separado. Encontramos un ejemplo de ello en el artículo de Lange⁷ en el que la atención se enfoca a la observación de lo que ocurre con el antígeno gp24 en la evolución de la enfermedad. Otro ejemplo es el trabajo de Midthun y colaboradores⁸ quienes exponen algunos de sus resultados de la siguiente manera de difícil comprensión: "El grupo de los indeterminados tiene las siguientes características: 85% tiene únicamente bandas de baja intensidad; 68% tiene una sola banda (p17, 6%; p24, 28%; p55, 17%; p51, 2%; p66, 15%); 32% tiene dos o más bandas (cualquier combinación de bandas de gag, 9%; bandas de pol, 2%; bandas de gag y pol, 17%; bandas de gag y env 2%; bandas de gag, poly env, 2%). Las bandas correspondientes a p24, p55 y p66 ocurrieron con la mayor frecuencia (47%, 34% y 36%) de los WB, respectivamente y aquéllas correspondientes a bandas de la envoltura ocurrieron menos frecuentemente (4%)".

El sistema de inmunoplot¹⁶ organiza la información obtenida de los WB en un plano y permite con mayor rapidez y facilidad, identificar antígenos específicos y compartidos entre dos categorías. En este trabajo se utilizaron dos tipos de análisis multivariados exploratorios: análisis de agrupamientos (dendograma) y ACP para agrupar a los

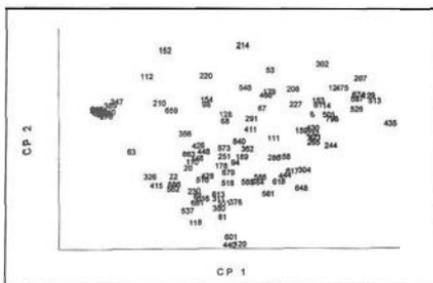


Figura 8. Resultado del ACP con datos cuantitativos. Los números en la gráfica corresponden al número de suero representado por cada punto. CP1 Componente principal 1; CP2 Componente principal 2 (en ambos ejes unidades relativas).

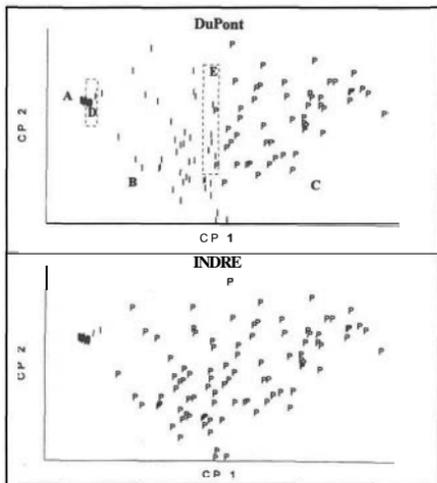


Figura 9. ACP con datos cuantitativos, substituyendo los puntos obtenidos por el diagnóstico según: gráfica superior) el criterio de Du Pont; gráfica inferior) el criterio del INDRE. P = Positivo; I = Indeterminado; N = Negativo. CP1 Componente principal 1; CP2 Componente principal 2 (en ambos ejes unidades relativas).

individuos de acuerdo a su Patrón Global de bandas y aprovechar la información que éstos pudieran proporcionar con respecto a la evolución de la enfermedad.

Utilizando la información cualitativa de presencia o ausencia de cada banda, el dendograma y el ACP (Figuras 5 y 7) dieron resultados satisfactorios y muy parecidos. Es de notar que el grupo 1A del dendograma está constituido por 16 individuos idénticos, representados en el ACP en un punto (grupo 1) y el resto de los individuos del grupo 1A corresponden exactamente a los individuos del grupo 2 de componentes principales.

Utilizando el criterio de diagnóstico del INDRE vemos que en 1A se encuentran todos los individuos diagnosticados como negativos e indeterminados. Hay problemas de clasificación sólo con dos individuos positivos que también quedaron incluidos en el grupo de negativos e indeterminados. En este sentido el ACP es mejor puesto que estos dos individuos se encuentran separados en la parte inferior del grupo 2. En el grupo 2A del

dendograma (grupos 3, 4, 5 y 6 del ACP) todos los individuos son positivos. La subclasificación de los individuos positivos en 2B, 3B y 4B (Figura 5), separa a las imágenes de patrones muy complejos (3B) del resto de las imágenes, habiendo agrupaciones que a simple vista no son tan obvias. Esto puede deberse a que el índice de similitudad toma en cuenta como características compartidas entre dos individuos, el hecho de que ambas carezcan de una cierta banda que aparece en el Patrón Global, y visualmente no registramos esta información. En cuanto al ACP las subclasificaciones 3, 4, 5 y 6 es más gradual: conforme se cambia de grupo aparecen más bandas y la frecuencia de reconocimiento de cada banda está en orden ascendente (Cuadros I y II).

En cuanto a criterios como el de Du Pont que utilizan la intensidad de cada banda según el registro visual, el resultado de ambos análisis fue menos satisfactorio puesto que tenemos individuos indeterminados en todos los grupos. Así pues, siguiendo los criterios de diagnóstico del INDRE se obtuvieron agrupamientos más cercanos y consistentes.

A diferencia del dendograma, el ACP permitió utilizar la información rigurosamente cuantitativa de densidad óptica. El análisis usando las 20 bandas del patrón propuesto le dio tanto peso a los antígenos propios del VIH que efectuando el mismo análisis únicamente con los antígenos virales dio, prácticamente, los mismos resultados. En cuanto al diagnóstico del INDRE se logra en este caso, una separación obvia entre los individuos positivos y los negativos o indeterminados. Si se trabaja con el criterio de Du Pont se logra también una buena separación, a excepción de las zonas limítrofes (Figura 9): en la zona D no es tan evidente la separación entre negativos e indeterminados pero en esta región encontramos solamente indeterminados con muy pocas bandas (1 o 2); en la zona E se encontraron individuos positivos. En realidad, si el diagnóstico se hubiera efectuado a simple vista, es probable que se hubiera clasificado a todos los individuos de esta zona, ya sea como indeterminados o como positivos.

Existe poca información acerca de la relación entre el patrón global de respuesta observado en el WB y la evolución de la enfermedad. Se sabe que anticuerpos contra p24 desaparecen cuando se manifiesta el síndrome.⁷ El estudio de Garland y colaboradores⁵ menciona que aun cuando el papel

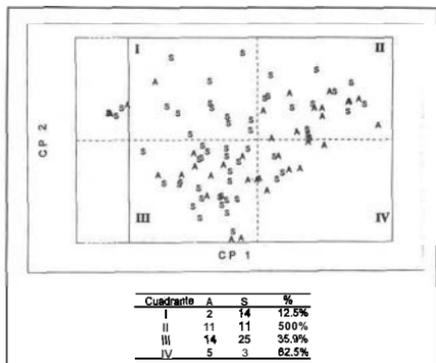


Figura 10. ACP cuantitativo mostrando la distribución de los individuos conforme a su sintomatología. A = Asintomático y S = algún síntoma. % = porcentaje de asintomáticos. CP1 Componente principal 1; CP2; Componente principal 2 (en ambos ejes unidades relativas).

de la respuesta humoral aún no ha sido completamente establecido, el tener anticuerpos específicos puede influir sobre el curso de la infección. Este estudio investigó la asociación entre la reactividad de los anticuerpos en las nueve proteínas vistas en el WB y las cuentas iniciales de células CD4. La cantidad de anticuerpos la cuantificaron asignándose valores de 0 a 3 a cada una de las bandas obtenidas en el WB. Usando regresión multivariada encontraron que los anticuerpos dirigidos en contra de la p24, p53 y p55 correlacionan positivamente con la cantidad inicial de CD4, en tanto que la gp41 correlaciona negativamente. En el análisis de correlación de imágenes con datos clínicos realizado en este trabajo, encontramos correlación entre la posición del individuo en el plano (Figura 10) y el hecho de ser asintomáticos o tener algún síntoma, resultando que hay un porcentaje mayor de individuos asintomáticos que presentan patrones de WB muy complejos, es decir, una respuesta humoral intensa y amplia. Esto concuerda con la existencia de una alta respuesta humoral en el periodo asintomático¹⁷ y con las observaciones de que un patrón indeterminado puede deberse a que el individuo tiene muy poco tiempo de infección o bien, reflejar el decaimiento de la respuesta inmune que caracteriza al SIDA.⁷

El interés por analizar en forma separada a los antígenos no propios del virus, se basa en la idea de que las bandas que no son del VIH podrían estar relacionadas con la presencia de autoanticuerpos. Observamos que estos anticuerpos no aparecen en patrones con pocas bandas. Por otra parte, el 79% de los individuos positivos (criterio INDRE) en este estudio tienen 8 o 9 bandas del patrón de Du Pont. Esto indica que diferencias finas entre patrones complejos, pueden deberse a los antígenos no propios del virus. No se encontró correlación entre patrones de dichas bandas y los datos de sintomatología de los que se disponía.

Este trabajo demuestra la posibilidad del diagnóstico automático del WB en la infección por VIH y, de forma más importante, muestra un camino viable para organizar y analizar las imágenes de WB, como un todo, sin perder las posibles correlaciones entre los antígenos. La identificación de numerosas bandas que no son del VIH exige un análisis metódico de su posible significado fisiopatológico, lo que habrá menester de expedientes clínicos completos y de manera ideal, de diseños en cohorte.

Agradecimientos

Agradecemos al doctor Eliot Parks la donación de equipos para western blot y a Isabel Pérez Montfort por la traducción del resumen en inglés.

Referencias

- Center for Infectious Diseases. Interpretation and use of the Western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. *JAMA* 1989;262; (24):3395-3397.
- Consortium for Retrovirus Serology Standardization. Serologic diagnosis of human immunodeficiency virus infection by Western blot testing. *JAMA* 1988;260(5):674-679.
- Schochetman G, Epstein JS, Zuck TF. Serodiagnosis of infection with the AIDS virus and other human retroviruses. *Annu Rev Microbiol* 1989;43:629-59.
- Schochetman G. Diagnosis of HIV infection. *Clínica Química Acta* 1992;211:1-26.
- Garland FC, Gorham ED, Brodine SK, Weiss PJ. Specific Western blot bands are associated with initial CD4 super (+) lymphocyte counts in human immunodeficiency virus seroconverters. *Ann. Epidemiol* 1994;4(1):27-31.
- Kleinman S, Fitzpatrick L, Secord K, Wilke D. Follow-up test nganonoifcint onofanti HIV Western blot atyp.cai (ndeterminant) onors Transl. *Sion* 1988 28 280-282

7. Lange JMA, Paul D, Huisman H, De Wolf F, Van Den Berg H, Coutinho RA, **Danner SA**, Van Der Noordaa J, Goudsmit J. Persistent HIV antigenaemia and decline of HIV core antibodies associated with transition to AIDS. *British Medical Journal*. 1986; (293):1459-1462.
8. **Midthun K, Garrison L, Clements ML, Fanadegan H, Femie B, Quinn T** and the NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network. Frequency of indeterminate Western blot tests in healthy adults at low risk for Human Immunodeficiency Virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 1990;162:1379-1382.
9. Ambis Image Acquisition & Analysis. Ambis Inc. 39 Ruffin Road, San Diego, CA 92123. USA, 1992.
10. CSS/pc, Release 2.1, Version 8640, StatSoft, Inc. 1988.
11. Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educ. Psychol.* 1933; 24, 417-41+498-520.
12. Krzanowski WJ. *Principles of multivariate analysis*. Clarendon Press. Oxford, 1990.
13. Pearson K. On lines and planes of closest fit to a system of points in space. *Phil. Mag.* 1901;2 (series 6):559-572.
14. Gnanadesikan R. *Methods for statistical data analysis of multivariate observations*. John Wiley, New York, 1977
15. Agresti A. *Analysis of ordinal categorical data*. John Wiley & Sons, New York. 1984.
16. Larralde C, **Montoya RM**, Sciutto E, Díaz ML, Govezensky T, **Coltorti E**. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*Taenia sodium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989;40(3):282-290.
17. **Weiss RA**. How does HIV cause AIDS? *Science* 1993;260: 1273-1278.