



VIH Y LABORATORIO. DETERMINACIONES DIAGNÓSTICAS

Tomàs Pumarola Suñé

Jefe de Sección de Virología. Servicio de Microbiología. Centro de Diagnóstico Biomédico (CDB). Hospital Clínic. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2 (VIH-1 y VIH-2) son los agentes etiológicos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), pero el más extendido y virulento es el VIH-1. Se clasifican en el género *Lentivirus*, perteneciente a la familia *Retroviridae*. Existen tres grupos distintos del VIH-1: el grupo M, el mayoritario en la pandemia del sida y que se subdivide a su vez en diversos subtipos (A a la K) y formas circulantes recombinantes; el grupo O (de *outlier* o marginal), del que se han descrito varios centenares de casos, casi todos procedentes de Camerún, y el grupo N, del que tan sólo hay 6 casos que se caracterizaron también en Camerún.

Las aplicaciones clínicas de las pruebas de detección directa e indirecta del VIH son: a) el diagnóstico de la infección, y en caso afirmativo; b) conocer cuál es la actividad replicativa del virus, como marcador pronóstico, de inicio y de eficacia del tratamiento antirretroviral y c) determinar la susceptibilidad vírica a los fármacos antirretrovirales. En el presente documento nos ceñiremos estrictamente al diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH.

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LABORATORIO DE LA INFECCIÓN POR VIH

Los retrovirus son causa de infecciones que persisten a lo largo de toda la vida de los sujetos infectados. Así, la demostración de una respuesta inmunitaria humoral específica refleja, invariablemente, la existencia de infección activa. Dadas las características biológicas del mismo, dichas personas deberán ser consideradas a todos los efectos como portadoras del virus y por tanto potenciales transmisoras del VIH por los mecanismos actualmente reconocidos.

La detección de anticuerpos específicos (Ac-VIH) en el suero de las personas infectadas es actualmente el único método homologado para el diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH. Por el contrario, en el diagnóstico de la infección en el recién nacido de madre infectada, la demostración del propio virus mediante la detección de sus ácidos nucleicos ha demostrado poseer una eficacia superior al diagnóstico serológico, siendo actualmente la técnica recomendada por las correspondientes Sociedades Científicas.

El diagnóstico de la infección por el VIH se basa en la utilización de reactivos comercializados. La fuerte competencia entre las distintas casas comerciales y el estricto control por parte de las agencias reguladoras en los diferentes países, ha conducido a la disponibilidad de reactivos estandarizados, de elevada sensibilidad, especificidad y automatización

PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

Pruebas de cribado

La detección de Ac-VIH con técnicas de enzimoimmunoensayo (EIA) es el método más empleado en la actualidad. De ellas existen distintos principios: indirecto, de captura y en sandwich. También hay métodos competitivos que aportan una elevada especificidad aunque presentan menor sensibilidad, especialmente durante la seroconversión.

La evolución de los antígenos incluidos en estas pruebas ha permitido obtener una elevada especificidad y sensibilidad, haciendo posible la detección de anticuerpos frente a tipos y subtipos del VIH que escapaban a los equipos de diagnóstico de primera generación. Las pruebas de tercera generación utilizan como antígeno proteínas recombinantes (PR) o péptidos sintéticos (PS) y generalmente un formato en sandwich que aporta una mayor sensibilidad durante la primoinfección al poseer la capacidad de detectar todas las subclases de anticuerpos y no sólo las IgG. Los reactivos diagnósticos actuales alcanzan valores de sensibilidad y especificidad del 99 %. No obstante, no debe olvidarse la importancia de los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN), que estarán condicionados por la prevalencia de la infección entre la población estudiada. A menor prevalencia, el VPP disminuye o, dicho de otra manera, mayor es la probabilidad de que se produzcan resultados falsamente positivos (Tabla 1).

La sensibilidad de las pruebas de cribado puede verse afectada por diferentes variables diagnósticas (Tabla 2). Existe la posibilidad de falsos negativos por variación antigénica viral. Este tipo de problemas fue descrito por primera vez tras la descripción del VIH-2. Un problema similar se observó tras el hallazgo del grupo O del VIH-1. Las mejoras introducidas en los reactivos de tercera generación permiten detectar anticuerpos frente al VIH-2 y los grupos M y O del VIH-1. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la probabilidad real de encontrar sueros de pacientes infectados por subtipos inusuales del VIH, sobre todo en pacientes africanos o en personas con estancias prolongadas en ese continente.

Una causa importante de falsos negativos es el denominado período ventana que se inicia tras el contacto con el VIH y que suele durar entre 4 y 12 semanas. Durante este periodo, que se corresponde con la fase de primoinfección, no es posible detectar la presencia de una respuesta humoral específica a pesar de existir niveles de viremia muy elevados. Debido a la existencia en la literatura de casos de seroconversión tardía, tras una exposición de riesgo no se descarta la infección hasta la obtención de una serología negativa a los 6 meses de haberse producido la exposición. Recientemente se han desarrollado pruebas de cuarta generación, que sobre

la base de un ensayo de tercera generación permiten la detección simultánea del antígeno p24-VIH-1, lo que permite reducir el periodo ventana aproximadamente en una semana. Sin embargo, estos reactivos presentan ligeros problemas de especificidad.

Relativas al suero

- Congelación y descongelación repetida
- Almacenamiento a temperatura subóptima
- Aspecto lipídico o turbio del suero
- Contaminación microbiana
- Sueros tratados con calor (>60° C)
- Errores de extracción o identificación

Relativas a autoanticuerpos

- Personas con autoanticuerpos anti-HLA-DR, DQw3
- Enfermedades reumatoideas
- Polimiositis
- Lupus eritematoso
- Multitrasfundidos
- Trasplantados renales
- Múltiparas

Relativas a otras condiciones

- Hemodializados
- Síndrome de Stevens-Johnson
- Administración previa de inmunoglobulinas
- Sueros postvacunales (gripe, hepatitis B)
- Infecciones agudas por virus ADN
- Enfermedad hepática alcohólica grave
- Cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante
- Pacientes con parasitosis (sanguíneas o tisulares)
- Pacientes con discrasias sanguíneas congénitas
- Usuarios de drogas por vía parenteral

Tabla 1. Causas de falsos positivos en las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH-1

Periodo ventana que precede a la aparición de anticuerpos
 Infección por tipos de VIH no detectables por los antígenos incluidos en la prueba
 Terapia inmunosupresora prolongada
 Trasplante de médula ósea
 Disfunciones de linfocitos B
 Plasmaféresis, exanguinotrasfusión
 Neoplasias
 Errores de extracción o identificación
 Fallos en el principio técnico o proceso de fabricación del reactivo diagnóstico
 Respuestas anómalas ante la infección por el VIH

Tabla 2. Causas de falsos negativos en las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH-1

En conclusión, para el cribado de Ac-VIH deben utilizarse reactivos que detecten anticuerpos frente al VIH-1 y VIH-2, posean una buena sensibilidad a los grupos M y O, y posean un elevado rendimiento en los paneles de seroconversión.

Una prueba de EIA reactiva para anticuerpos frente al VIH-1 debe ser repetida en la misma muestra antes de ser valorada como tal. Todas las muestras con EIA repetidamente reactiva deben ser analizadas mediante una prueba de confirmación, generalmente el western blot (WB) (Figura 1).

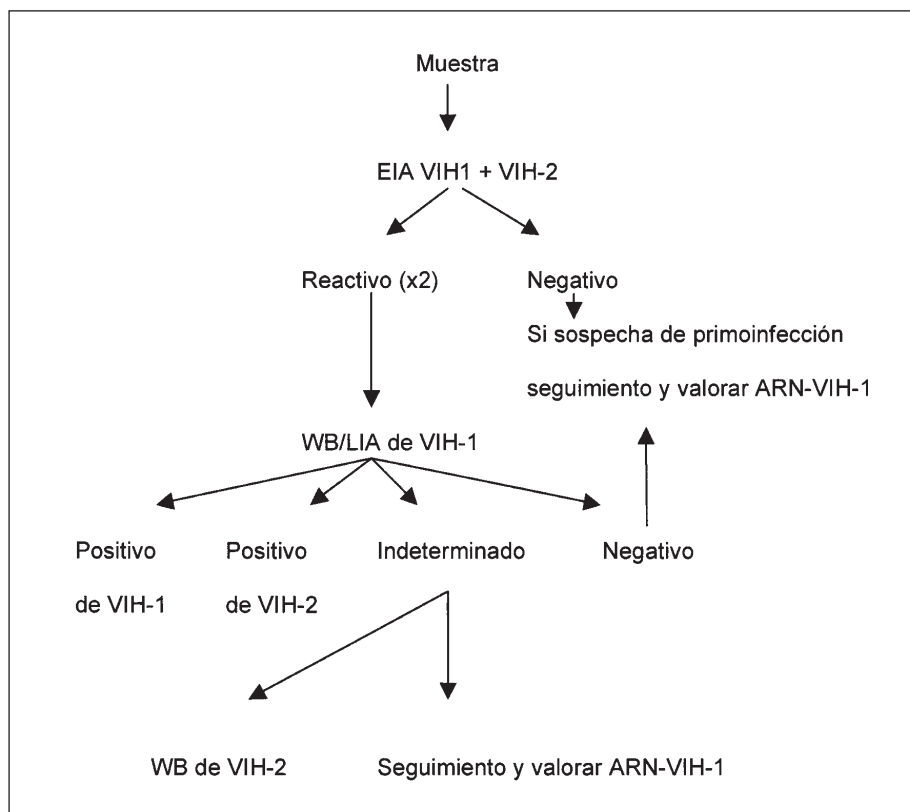


Figura 1. Algoritmo diagnóstico de la infección por VIH-1

Los resultados de las pruebas de cribado deben expresarse de forma clara y precisa para evitar situaciones diagnósticas confusas y de ansiedad innecesaria en el paciente. Así, se expresará con claridad si el suero es positivo para Ac VIH-1/2, indicando el tipo y naturaleza de la prueba de cribado utilizada. La expresión en unidades arbitrarias o en unidades de valor de corte añadida a la expresión cualitativa en las técnicas de EIA, indican una mayor o menor reactividad de la muestra con respecto al valor de corte obtenido y no una expresión numérica de la cantidad de anticuerpos presentes en el suero. En los resultados positivos o débilmente reactivos se indicará la necesidad de confirmar dicha reactividad.

Pruebas de diagnóstico rápido

Las pruebas de diagnóstico rápido son ensayos de lectura visual que pueden realizarse con un equipamiento mínimo de laboratorio y generan un resultado en menos de 30 minutos. En la actualidad, la mayoría de pruebas de cribado también generan resultados en un tiempo relativamente corto, inferior a 90 minutos. Así, la principal indicación de las técnicas rápidas será para su utilización en laboratorios con escasa dotación instrumental o bien en situaciones de urgencia. Deberá tenerse en cuenta su menor sensibilidad y especificidad y la subjetividad en la lectura. La aglutinación y el EIA de membrana (dot-blot) han sido las técnicas más ampliamente utilizadas. En los últimos años, han aparecido pruebas rápidas basadas en el principio de la inmunocromatografía capilar que han mejorado de forma importante la sensibilidad y la especificidad de éstas respecto a las anteriores. Se deben elegir aquellas que tengan controles internos que verifiquen el correcto funcionamiento de la reacción.

Pruebas de detección de anticuerpos en saliva y orina

Es posible la detección de Ac-VIH en muestras de saliva y orina. Sus principales ventajas son el método incruento de obtención de la muestra y la disminución del riesgo de exposición accidental en el personal sanitario. La existencia de falsos negativos, derivados de la posible baja concentración de anticuerpos o de una obtención errónea de la muestra, especialmente en el caso de la saliva, constituye su principal inconveniente. Así, su uso se haya recomendado, casi exclusivamente, para estudios de vigilancia epidemiológica.

Pruebas de Confirmación

Tienen como objetivo confirmar los resultados obtenidos por las pruebas de cribado utilizando técnicas con fundamentos distintos y más específicos. La prueba de confirmación más frecuentemente utilizada es el Western-Blot (WB). Si bien hay que reconocer que, en comparación a las pruebas de cribado que han ido evolucionando a lo largo de los años, el WB continua siendo una prueba de 1ª generación con todos los problemas que ello comporta, como la escasa sensibilidad en los paneles de seroconversión o la reactividad inespecífica frente a determinadas proteínas presentes en las tiras de reacción. Otros métodos de confirmación como la inmunofluorescencia o la radioinmunoprecipitación, presentan una alta subjetividad y complejidad, respectivamente, que dificultan su utilización.

El WB permite una discriminación puntual de las especificidades de reactividad de anticuerpos frente a las distintas proteínas del virus. Las tiras de nitrocelulosa en las que se han transferido las proteínas víricas contienen, generalmente, casi todas las proteínas estructurales del VIH, algunas proteínas precursoras de aquellas, y antígenos celulares contaminantes que proceden de las células en cultivo empleadas para la obtención del antígeno vírico. Algunos reactivos de WB para VIH-1 incorporan, en la misma tira de nitrocelulosa, algún péptido sintético correspondiente a glicoproteínas específicas del VIH-2.

La lectura e interpretación de los resultados por WB debe hacerse siguiendo unas pautas concretas. En primer lugar se identificarán, por su posición en la tira, las bandas específicas de reactividad (gp160, gp120, p66, p55, etc.). A continuación puede ser útil asignar un valor de reactividad a cada banda (2: reactividad franca; 1: reactividad débil o dudosa y 0: ausencia de reactividad) y anotarlo de forma individualizada. Aunque la técnica no es cuantitativa, el laboratorio puede, de esta forma, archivar los resultados de forma más detallada, aunque las tiras se hallan deteriorado o eliminado.

Existen distintos criterios de positividad para el WB (tabla 3), de ellos parece el más adecuado el propuesto por la OMS, que resulta el más sensible cuando se manejan sueros de muy variada procedencia poblacional. Adoptando este criterio, un suero es considerado positivo cuando presenta reactividad al menos frente a 2 de las tres glucoproteínas de envoltura que posee el virus (gp160, gp120 y gp41). Los sueros negativos no deberán mostrar reactividad frente a ninguna de las proteínas presentes en la tira. Finalmente, los sueros se denominan indeterminados por WB cuando, existiendo reactividad frente a una o más proteínas, no cumple el criterio de positividad adoptado.

Los criterios de positividad más restrictivos, si bien son altamente específicos, se traducen en una falta de sensibilidad y en un incremento de los resultados indeterminados. Adicionalmente, como ya se ha comentado, el WB puede dar lugar a falsos negativos durante la primoinfección por VIH, a consecuencia de su menor sensibilidad respecto de las pruebas de cribado.

En los WB indeterminados se observan frecuentemente reactividades únicas frente a una banda del core vírico (p24, p55, etc.) y en otras ocasiones frente a componentes celulares contaminantes de las tiras de nitrocelulosa o epítomos no víricos que aparecen en el proceso de manufacturación del WB. Las causas más importantes de WB indeterminado son: la infección por VIH-2; el inicio de seroconversión durante la primoinfección; la enfermedad avanzada y los niños nacidos de madre seropositiva, tanto si se trata de niños verdaderamente infectados como de portadores de anticuerpos maternos durante el primer año de vida. También se han descrito WB indeterminados en personas con factor reumatoide, lupus eritematoso, concentraciones de bilirrubina elevadas, anticuerpos contra determinados antígenos del sistema HLA y en pacientes hemodializados.

Criterio	Reactividad frente al menos
Organización Mundial de la Salud (OMS)	Dos glucoproteínas cualquiera de: gp160/gp120/gp41
Food and Drug Administration (FDA)	p24 + p32 + (gp41 o gp120 o gp160)
Cruz Roja Americana	Una proteína de cada gen estructural (env, gag y pol)
Consortium for Retrovirus Serology and Standardization (CRSS)	p24 + (gp41 o gp120 o gp160) ó p32 + (gp41 o gp120 o gp160)
Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors/ Center for Diseases Control	p24 + (gp41 o gp120 o gp160) ó gp41 + (gp120 o gp160)

Tabla 3. Criterios de positividad para VIH-1 por la técnica de Western-Blot

En los sueros indeterminados, el seguimiento mediante análisis seriados debe prolongarse al menos durante 6 meses para verificar si existe un cambio en el patrón de anticuerpos hacia la positividad o por el contrario desaparecen las bandas detectadas inicialmente. Las personas con resultados persistentemente indeterminados al cabo de 6 meses, en ausencia de factores de riesgo y síntomas o hallazgos clínicos compatibles con la infección VIH, deben considerarse negativas para Ac-VIH. Ante la presencia aislada de la banda de la matriz nuclear p17, el WB puede considerarse negativo, no siendo necesario el seguimiento posterior.

Finalmente, al emitir los resultados del WB, estos expresarán de forma inequívoca si el sujeto es positivo o negativo para Ac-VIH-1 o VIH-2. En los casos de sueros con resultados no interpretables o indeterminados en estas pruebas, se expresará claramente que la presencia de Ac-VIH no ha sido confirmada, recomendándose en dichos casos un seguimiento serológico y remisión de nuevas muestras para confirmación por WB u otras técnicas. En los casos de WB indeterminados deberían expresarse las reactividades observadas con objeto de poder interpretar correctamente el seguimiento.

En conclusión, la técnica de WB es una prueba de confirmación que en el momento actual es fácilmente adaptable a laboratorios de equipamiento medio, que no tengan un excesivo número de muestras a confirmar y que requiere un cierto entrenamiento para su interpretación y lectura.

Se han desarrollado pruebas accesorias de confirmación basadas principalmente en el inmu-

noanálisis de tipo lineal (LIA). Incorporan PS o PR del VIH-1 y del VIH-2 sobre un soporte plano. Poseen una excelente sensibilidad y especificidad, lo que permite considerar su uso como pruebas de confirmación. Sin embargo, también son causa de resultados indeterminados.

PRUEBAS DE DETECCIÓN DEL VIH

En ocasiones, la utilización de pruebas de detección del VIH pueden ser de ayuda en el diagnóstico de la infección. Ello suele acontecer en muestras de pacientes con actividad de riesgo reciente o con signos y síntomas de infección aguda por VIH y en todas aquellas muestras con resultado de anticuerpos indeterminado. Además, son la principal herramienta en el diagnóstico de la infección congénita. Estas pruebas se basan en la amplificación de los ácidos nucleicos víricos. Debido a la ausencia actual de reactivos comercializados de amplificación del ADN-VIH-1, la prueba utilizada como ayuda en el diagnóstico de la infección, es la cuantificación del ARN-VIH-1 en plasma o carga vírica. La detección del antígeno del core p24 de forma aislada, fuera del contexto de los ensayos de cuarta generación, se haya en desuso debido a su baja sensibilidad.

Detección de ácidos nucleicos

La base de este diagnóstico reside en la demostración de parte del genoma vírico a partir de linfocitos de sangre periférica (ADN-VIH-1) o del plasma (ARN-VIH-1). Mientras que la infección de una célula por el VIH-1 tiene un carácter irreversible y de ello es testimonio la presencia del ADN proviral incorporado a sus cromosomas de modo permanente, la detección de ARN del VIH-1 refleja el grado de replicación vírica y se ha utilizado como factor pronóstico y de inicio y eficacia del tratamiento antirretroviral.

Respecto al diagnóstico de la infección por el VIH, aunque estas técnicas han demostrado poseer una mayor sensibilidad que el diagnóstico serológico en determinadas situaciones, no debe olvidarse que: no se hayan homologadas para su uso diagnóstico; pueden ser causa de falsos negativos (reducido número de células portadoras del virus o baja replicación de éste); no detectan ni el VIH-2 ni el grupo O de VIH-1; no detectan adecuadamente todos los subtipos del VIH-1, a pesar de las mejoras realizadas en la última generación de reactivos y se ha descrito hasta un 4 % de falsos positivos en población sin factores de riesgo. Por tanto, en ausencia de anticuerpos específicos su aplicación e interpretación deberá realizarse con una escrupulosa consideración del contexto clínico en cada caso individualizado.

DIAGNÓSTICO DE LA PRIMAINFECCIÓN

Durante la primoinfección, la síntesis de anticuerpos específicos se inicia a las pocas semanas de la infección por VIH. El tiempo necesario para la detección de anticuerpos en las pruebas serológicas dependerá de la dosis infecciosa, el mecanismo de transmisión y de la sensibilidad de la prueba serológica utilizada. En los estudios basados en pruebas de cribado de 1ª gene-

ración se ha estimado un promedio de 45 días para la seroconversión tras la primoinfección, siendo el período ventana inferior a las 20 semanas en el 90 % de los pacientes. La utilización de las actuales pruebas de 3ª generación ha conseguido reducir en 20,3 días (IC95 %, 8-32,5) el período ventana; el antígeno p24 en suero y la detección cualitativa de ADN en linfocitos de sangre periférica lo han reducido en 26,4 días (IC 95 %, 12,6-38,7) y la cuantificación del RNA-VIH en plasma en 31 días (IC 95 %, 16,7-45,3).

La estrategia diagnóstica ante la sospecha de primoinfección VIH incluirá necesariamente la detección de anticuerpos totales con las siguientes consideraciones: a) un resultado negativo puede ser debido a: 1) la ausencia de infección o 2) el paciente se halla en el período ventana. En ambas situaciones se procederá a la realización de determinaciones seriadas de anticuerpos a las 2 y 4 semanas y a los 3 y 6 meses para confirmar la ausencia o presencia de infección VIH; b) En caso de realizarse detección de carga vírica conjuntamente con la determinación de anticuerpos específicos, deberá tenerse en cuenta que un resultado de anticuerpos negativo con presencia de ARN-VIH-1 en plasma puede ser indicativo de infección reciente en caso de cuantificaciones superiores a los 4-6 log₁₀. Sin embargo, se procederá a realizar determinaciones seriadas de anticuerpos siguiendo la pauta indicada en el punto anterior, de tal forma que no se establecerá un diagnóstico definitivo hasta obtener un resultado de anticuerpos en el sexto mes de seguimiento.

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN CONGÉNITA

El diagnóstico de la infección congénita se basa en la detección de la carga vírica en el recién nacido en determinaciones seriadas hasta los tres meses de edad con la siguiente pauta de muestreo: primera semana de vida; al mes; a los dos meses tras la retirada del tratamiento preventivo y a los tres meses de edad. El recién nacido se diagnostica como infectado si dos muestras consecutivas son positivas. A partir de los 18 meses de edad, el diagnóstico es idéntico al del adulto.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA INFECCIÓN POR VIH-2

El contexto epidemiológico debe orientar el diagnóstico de infección por VIH-2. En España desde hace algunos años se han documentado infecciones por VIH-2 principalmente en inmigrantes africanos y esporádicamente en sujetos españoles o europeos que han vivido en África Occidental o que han mantenido relaciones sexuales con nativos de esa región.

En el diagnóstico de la infección, una buena combinación es la utilización de un EIA indirecto (VIH-1+2) y un EIA competitivo (VIH-1). Una positividad elevada en el primero y negativo o débilmente positivo en el segundo, es muy sugerente de infección por VIH-2.

La confirmación, mediante WB, de una infección por VIH-2, se debe realizar con sueros reactivos en las pruebas de cribado para VIH-1/2 y no confirmados o indeterminados en las pruebas

de confirmación para VIH-1. Para la interpretación del resultado se seguirá el criterio de la OMS anteriormente mencionado (reactividad frente al menos dos glucoproteínas: gp140, gp105 o gp36).

En conclusión, la identificación de infección por VIH-2 se aconseja sólo en los casos de reactividad repetida en pruebas de cribado y con resultados indeterminados en las pruebas de confirmación frente al VIH-1 en individuos con factores de riesgo de infección por VIH-2.

BIBLIOGRAFÍA

Branson BM. State of the art for diagnosis of HIV infection. Clin Infect Dis. 2007 Dec 15;45 Suppl 4:S221-5

CDC. US Public Health Service guidelines for testing and counselling blood donors and plasma donors for HIV type 1. MMWR 1996; 45:3-8.

Daar ES. Incorporating novel virologic tests into clinical practice. Top HIV Med. 2007 Aug-Sep;15(4):126-9

Kaufmann GR, Duncombe C, Zaunders J, Cunningham P, Cooper D. Primary HIV-1 infection: a review of clinical manifestations, immunologic and virologic changes. AIDS Patient Care STDS. 1998 Oct;12(10):759-67

López-Bernaldo de Quirós JC, Delgado R, García F, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R. Microbiological diagnosis of HIV infection. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007 Dec;25(10):632-8.

Miró JM, Sued O, Plana M, Pumarola T, Gallart T. Advances in the diagnosis and treatment of acute human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004 Dec;22(10):643-59.

Pilcher C D, Fiscus S A, Nguyen T Q, et al. Detection of acute infections during HIV testing in North Carolina. N Engl J Med 2005; 352:1873-1883.

Preiser W, Brink NS, Hayman A, et al. False negative HIV antibody test results. J Med Virol 2000; 60:43- 47.

Rouzioux C, Chaix ML. Diagnosis and virologic monitoring of HIV infection. Rev Prat. 1999 Oct 15;49(16):1747-9.

Schüpbach J, Gebhardt MD, Tomasik Z, Niederhauser C, Yerly S, Bürgisser P, Matter L, Gorgievski M, Dubs R, Schultze D, Steffen I, Andreutti C, Martinetti G, Güntert B, Staub R, Daneel S, Vernazza P. Assessment of recent HIV-1 infection by a line immunoassay for HIV-1/2 confirmation. PLoS Med. 2007 Dec;4(12):e343.

WHO. AIDS. Proposed WHO criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2 and HTLV-I/HTLV-II. Weekly Epidem Rec 1990; 65:281-283.

Yilmaz G. Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy. J Clin Virol. 2001 Jun;21(3):187-96

EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO COMITÉ DE EDUCACIÓN

M.C. Villà (*presidenta*), D. Balsells, M. Gassó, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, M. Rodríguez

ISSN 1887-6463

Noviembre 2009