

3.5 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LA INFECCIÓN VIH

Existen muchas pruebas de laboratorio relacionadas con la infección por VIH, algunas de ellas sirven para tamizar la sangre en los bancos de sangre, otras para el diagnóstico de la infección y otras para el monitoreo de la progresión de la enfermedad por VIH.

Las pruebas pueden clasificarse como inmunológicas o virológicas; las inmunológicas pueden identificar los anticuerpos que la persona produce en respuesta a la infección o el daño que el virus causa al sistema inmune, en tanto que las virológicas pueden identificar el virus mismo (por cultivo), sus proteínas estructurales o su material genético.

Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la infección por VIH deben siempre confirmarse.

Para el diagnóstico se recurre generalmente a dos pruebas; inicialmente se hace una prueba de tamización inicial mediante una técnica de ELISA para detectar anticuerpos contra el virus, y si ésta da positiva, se debe repetir. Si nuevamente da positiva, se procede a hacer una prueba confirmatoria, que en nuestra Norma local consiste en un Western Blot. La muestra que se utiliza para el diagnóstico es casi siempre plasma o suero, pues a pesar de que como se mencionó antes, el VIH se puede detectar en numerosas secreciones o fluidos corporales, en la sangre es donde se encuentra una mayor concentración de componentes virales.

A continuación se hará una descripción breve de estas metodologías y sus indicaciones.

ELISA

ELISA o inmunoanálisis enzimático es el método más usado para la tamización de pacientes infectados por VIH-1 o VIH-2. Es una prueba relativamente fácil de realizar y en nuestro medio se utiliza también como prueba para detectar sangres contaminadas por el virus en los bancos de sangre. La sensibilidad y especificidad para esta técnica son mayores de 99%, aunque varían un poco de estuche a estuche, teniendo en cuenta que existen disponibles más de 50 diferentes. La técnica de ELISA más común consiste en la búsqueda de anticuerpos contra el VIH. Para esto se adhieren antígenos del virus en los pozos de un plato de ELISA y se agrega la muestra. Si la muestra contiene anticuerpos contra el VIH, éstos se adhieren a los antígenos fijados al pozo. Luego de lavar los pozos para remover el resto de la muestra del paciente diferente a los anticuerpos anti-VIH se adiciona un conjugado (otro anticuerpo marcado con una enzima). Posterior a un nuevo lavado, se agrega un sustrato que induce un cambio de color en la reacción si hay presencia de anticuerpos contra el VIH en la muestra del paciente. Los anticuerpos contra el VIH se comienzan a producir poco después de la infección primaria y pueden ser detectados por primera vez a las 3 ó 4 semanas; este período de ventana puede acortarse unos días si se realizan pruebas más sensibles como son las que buscan antígenos o material genético viral. Debido a los posibles falsos positivos en estas pruebas de tamización, es preferible utilizar el término “reactiva” que “positiva”.

Una prueba reactiva por ELISA debe ser repetida por duplicado antes de hacer la prueba confirmatoria por Western blot; sólo hasta entonces se podrá catalogar como una “prueba positiva para VIH”. Si una de las pruebas repetidas es negativa, la causa más común es un error técnico.

Resultados falsos positivos se pueden presentar en personas con enfermedades hematológicas malignas, infecciones agudas causadas por virus DNA, enfermedades autoinmunes y presencia de autoanticuerpos, hepatitis alcohólica, falla renal, fibrosis quística, embarazos o transfusiones múltiples, pacientes en hemodiálisis, presencia de anticuerpos antiHLA-DR4 y cuando ha habido vacunación para la hepatitis B, rabia o influenza.

De la misma manera, las pruebas pueden arrojar resultados falsos negativos, usualmente debido a que la técnica falla en identificar a las personas infectadas durante el período de ventana, antes de que ocurra la seroconversión. Otras causas de falsos negativos incluyen una hipogammaglobulinemia severa, defectos funcionales de las células B (encargadas de la producción de anticuerpos), quimioterapia, infección por un subtipo de VIH no detectable con ese estuche determinado o un error técnico en el laboratorio. En estos casos, si hay evidencia de una probable infección, se debe recurrir a la detección de antígenos (como el p24) o material genético viral (RNA del VIH o carga viral).

La prueba de ELISA que busca anticuerpos no tiene utilidad para identificar los hijos infectados de madres VIH positivas, ya que los anticuerpos de la madre atraviesan la placenta y pueden persistir hasta por 18 meses. Para el diagnóstico de infección vertical debe entonces recurrirse también a la detección de antígenos virales o RNA del VIH.

La técnica de ELISA no sólo sirve para detectar anticuerpos contra el VIH en la sangre de los pacientes, sino que también se puede utilizar para detectar directamente el virus circulante. En este caso se fijan a la fase sólida del estuche los anticuerpos contra el VIH y se busca en la muestra del paciente usualmente el antígeno viral p24. El resto del procedimiento es prácticamente el mismo. El antígeno p24 es una proteína producida por el gen gag que puede ser detectado en la mayoría de las personas entre 2 y 3 semanas después de la infección. La tasa de falsos positivos es alta para esta prueba debido a sustancias en el suero que pueden causar interferencia con la prueba, como sucede con la presencia de complejos inmunes (antígeno-anticuerpo).

Para que la prueba del antígeno p24 pueda considerarse positiva, debe repetirse con una nueva muestra y hacerle una prueba de neutralización complementaria, que demuestre que al agregarle a la muestra del paciente (con el antígeno p24) anticuerpos contra este antígeno, la prueba de ELISA se negativiza al bloquearse los antígenos presentes. Esta prueba tiene mayor utilidad para identificar los hijos positivos para VIH de madres infectadas, ya que como se mencionó, los anticuerpos de la madre atraviesan la placenta. La sensibilidad de la prueba para el antígeno p24 al momento del parto (neonatos) es del 100%, aunque su especificidad es sólo del 18%; sin embargo, esta especificidad también aumenta al 100% entre los 3 y 6 meses de edad, para volver a disminuir más adelante. La prueba que detecta antígeno p24 también tiene utilidad en el seguimiento de los pacientes infectados con VIH, se ha demostrado que tiende a desaparecer en la fase de latencia clínica y comienza aumentar en el 60% de los pacientes en el momento de la progresión clínica hacia SIDA. La terapia con zidovudina también puede disminuir la presencia del antígeno en la sangre.

Una técnica más reciente que se usa con frecuencia es el MEIA (inmunoensayo enzimático con micropartículas). Se basa en el mismo principio del ELISA; sin embargo, en vez de usarse un microplato con pozos como fase sólida para fijar los antígenos, se utilizan unas micropartículas en suspensión. La detección es mediante el atrapamiento de las micropartículas en una membrana y haciendo la detección igual al ELISA por reacción enzimática.

Finalmente están las pruebas de cuarta generación, las cuales combinan la detección de anticuerpos contra el VIH y la detección del antígeno p24; esta prueba busca reducir el tiempo de la ventana inmunológica detectando el antígeno del virus cuando aún no se han producido los anticuerpos. En los bancos de sangre en nuestro medio se utiliza esta prueba de ELISA en “combo” antígeno/anticuerpo, para tamizar las muestras de sangre.

En los países desarrollados se usa una prueba de amplificación de ácido nucleico (NAT) automatizada, con sensibilidad y especificidad superiores al 99,5%, que permite disminuir el riesgo de transmisión por donación del VIH a un caso en 2 millones, al ser capaz de detectar la presencia de RNA del VIH en el plasma del paciente hasta 12 días antes que el ELISA y entre 3 y 6 días antes de que el antígeno p24 sea detectable. Esta prueba automatizada permite a la vez el tamizaje de las muestras para la presencia del virus de la hepatitis B y C.

Western blot

Es la prueba más utilizada para confirmar la infección por VIH y se debe realizar en una nueva muestra del paciente. Consiste en separar las proteínas de un extracto viral del VIH mediante electroforesis, de acuerdo con su peso molecular, para luego ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana es incubada con el suero del paciente con sospecha de infección por VIH. Si la muestra contiene anticuerpos, éstos se unirán a las áreas correspondientes a los antígenos contra los cuales están dirigidos. La reacción antígeno-anticuerpo se revela posteriormente con la ayuda de un anticuerpo secundario marcado con una enzima, que al agregarle el sustrato muestra las “bandas” en la membrana de nitrocelulosa. Las bandas que aparecen en el Western blot se designan “p” para proteínas y “gp” para glicoproteínas, seguidas de un número que corresponde a su peso molecular. Las proteínas se dividen en 3 grupos: las glicoproteínas de la envoltura env (gp41, gp120 y gp160), las proteínas nucleares gag (p18, p24/25 y p55) y las proteínas endonucleasa-polimerasa pol (p34, p40, p52 y p68). Esta prueba se realiza usualmente en laboratorios especializados de referencia, ya que un error en su interpretación puede tener graves consecuencias para el paciente, si es un falso positivo no sólo en el aspecto emocional sino que puede ser sometido a un tratamiento innecesario, o en el caso de un falso negativo puede no recibir un tratamiento a tiempo y convertirse en un importante diseminador de la infección.

Los criterios para la interpretación del resultado de esta prueba varían dependiendo de la institución; por ejemplo, para la Cruz Roja norteamericana sólo es positiva si aparecen al menos 3 bandas, una de cada grupo (gag, pol y env), en tanto que para la OMS una muestra es positiva con sólo 2 bandas de env. La muestra que presenta bandas que no cumplan con el criterio anterior se considera con un resultado “indeterminado”. Este resultado es frecuente, hasta un 20%, en los pacientes con un ELISA reactivo durante la fase temprana de la infección. Igualmente pueden ocurrir errores en la interpretación del resultado si hay contaminación cruzada con muestras positivas adyacentes, cuando hay presencia de anticuerpos anti-HLA en el preparado viral y cuando hay anticuerpos inespecíficos o autoanticuerpos en la muestra del paciente que puedan reaccionar con los antígenos virales fijados en la membrana. En los pacientes con resultados indeterminados se recomienda hacer un seguimiento y repetir las pruebas después de tres a seis meses, dependiendo de los factores de riesgo identificables en el paciente. Después de 6 meses la mayoría de los resultados indeterminados en personas infectadas por VIH se harán positivos. Es por esto que es fundamental la correlación de las pruebas de laboratorio con la clínica y con la epidemiología de los pacientes con sospecha de infección por VIH.

RNA del VIH o carga viral.

La cuantificación de la carga viral en el plasma o en las células mononucleares de sangre periférica se puede hacer por tres métodos: RT-PCR (PCR con transcriptasa reversa), bDNA (DNA ramificado) o NASBA (amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos). Estas pruebas son de gran utilidad para monitorear el progreso de la infección por VIH independiente del recuento de linfocitos CD4. Los resultados son reportados en copias virales por mililitro de sangre y pueden variar de método a método, por lo cual se recomienda utilizar el mismo método consistentemente. La carga viral tiende a aumentar a medida que el recuento de linfocitos CD4 positivos disminuye. Los niveles de RNA del VIH varían con el estadio de la infección. Al inicio de la infección se presenta un pico virémico que luego disminuye durante la fase latente de la infección, como se mostró en la figura 10. Estos niveles vuelven a aumentar cuando el paciente progresa a SIDA y se correlaciona con los niveles del antígeno p24, pero es más sensible y es un factor predictivo de la progresión a SIDA independiente del recuento de células CD4. Se ha observado que menos de la mitad de las personas con niveles bajos.