

DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LABORATORIO EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Lic. María Eugenia Pacheco

*Departamento de Virología, Jefe de la Sección de Programas Especiales: Hepatitis y SIDA
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*

Dra. Ana Monzón de Orozco

Jefe del Laboratorio de Inmunología. Instituto de Hematología y Oncología

RESUMEN

Durante la infección con VIH hay la aparición de muchos indicadores biológicos de infección, replicación o ambas.

Las técnicas más comúnmente usadas para el diagnóstico y monitoreo de la infección son: los ensayos serológicos (Inmunoenzimáticos, confirmatorios), detección de proteína viral (Ag p24), cultivo de virus y pruebas moleculares (PCR, Carga viral, determinación de CD4, CD8 y relación de CD4/CD8).

Entre los ensayos serológicos, los inmunoenzimáticos son los más utilizados para la determinación de anticuerpos, ellos emplean una variedad de antígenos o proteínas virales estructurales en una serie de formatos que incluyen ensayos indirectos, competitivos, en sándwich y de captura. Los ensayos confirmatorios son altamente específicos y se utilizan para confirmar todos los ensayos inmunoenzimáticos Reactivos.

La detección de proteína viral circulante, cultivo de virus y pruebas moleculares se utilizan para el diagnóstico en niños hijos de madre seropositivas, en adultos en periodo de ventana inmunológica, para medir replicación viral, progresión de la enfermedad, evaluación de la terapia antirretroviral entre otras.

La determinación cuantitativa de la viremia pone de manifiesto que el aumento del número de virus en sangre periférica se relaciona con un mayor riesgo de progresión clínica de la infección por VIH, las técnicas más usadas son las de amplificación de ácidos nucleicos y amplificación de señal.

La determinación de células en pacientes infectados con VIH se conoce con el nombre de inmunofenotipo, la razón primaria para el inmunofenotipaje de pacientes con infección por VIH es el conteo de linfocitos TCD4, TCD8 relación TCD4/TCD8.

Las características de la infección por VIH hacen de esta enfermedad una excelente candidata para la aplicación de marcadores clínicos en el manejo de pacientes, en la práctica médica y en la toma de decisiones

ABSTRACT

During the HIV infection appears many biological infections, replication or even both of them.

The commonest applied techniques for diagnosis and study of this infection are: serologic assay (immunoenzymatics, confirmatories), virus culture and molecular tests (PCR, Viral load, CD4 determination, CD8 and relation CD4/CD8).

In all serological assays the immunoenzymatic are the must used to determinate antibodies, using a variety of antigens or structural virus proteins in a series of formats including indirect assay, competitive, capture and sandwich assay. The confirmation assays are highly specifics and are used to confirm all the immunoenzyme Reactive assays.

The detection of circulate virus protein, virus culture and molecular tests are used for the diagnosis with children who have seropositive mothers, in adults through the immunological window, period to measure the virus replication, the progress of diseases and to evaluate the antiretroviral therapy.

The quantitative determination of viremia shows that the increasing of viruses' periphery blood is related with a number in major risk of HIV clinical infection progress, the most used techniques are amplification of nucleic acids and signed amplification.

The cell determination for HIV infected patients is known as immunophenotype; the first reason for using this technique is to count the lymphocytes TCD4, TCD8 and relation TCD4/TCD8.

The HIV infection characteristics make this to be and excellent candidate for the application of clinical markers in patient's treatment and in the medical practice and the decision choice.

INTRODUCCIÓN

Durante la infección del VIH hay la aparición de muchos indicadores biológicos de infección viral, replicación o ambos en los diferentes estadíos clínicos; tales indicadores incluyen: viremia, anticuerpos contra las proteínas virales, proteínas virales circulantes y marcadores no específicos de infección tales como neopterina, $\beta 2$ microglobulina y cambios en el número absoluto de la relación de células CD4 / CD8^{1,2}.

Los marcadores más comúnmente usados son: los ensayos serológicos, la detección de proteínas virales, cultivo de virus y pruebas moleculares que se usan para diagnóstico de la infección, monitoreo de la progresión de la enfermedad, evaluación de la eficacia de las drogas antiretrovirales y el diagnóstico de la infección en recién nacidos hijos de madres seropositivas.¹

Los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) para determinación de anticuerpos contra el VIH son a menudo los más utilizado para el diag-

nóstico de la infección. Hoy día existen ensayos que permiten simultáneamente detectar anticuerpos a proteínas virales tanto del VIH1 como del VIH2 en un solo ensayo, permitiendo así cambios en los algoritmos y simplificación de los ensayos.¹

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIH

Ensayos de diagnóstico iniciales

Ensayos inmunoenzimáticos (EIA)

Estos emplean una variedad de antígenos o proteínas virales estructurales tanto del VIH1 como del VIH2, los antígenos incluyen: lisado viral completo, proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, algunos ensayos emplean una combinación de tipos de antígenos para alcanzar la sensibilidad deseada y son usados en una variedad de formatos, incluyendo ensayos indirectos, competitivos, en sandwichs y anticuerpos de captura, todos estas modalidades y antígenos han sido usados para mejorar la sensibilidad y especificidad de los mismos.

Los EIA indirectos son los más usados para la detección de anticuerpos. El lisado viral completo, la (las) proteína(s) recombinante(s) o el(los) péptido(s) sintético(s) se une a un soporte sólido y el suero del paciente es incubado con el antígeno ya fijado. La detección del complejo antígeno-anticuerpo se revela con un conjugado anti-IgG humana marcado con una enzima: tal como la fosfatasa o la peroxidasa, luego en presencia del sustrato hay un cambio de color que es proporcional a la cantidad de anticuerpos presente en el suero o plasma.

Los EIA competitivos usan los mismos antígenos que el método indirecto, los cuales se unen a una fase sólida. El suero o plasma del paciente se añade al pozo simultáneamente con un anticuerpo específico anti VIH estándar marcado con una enzima. Estos ensayos son seguros y precisos, en contraste con los métodos indirectos. La intensidad de la reacción del color está inversamente relacionada con la cantidad de anticuerpos presente en la muestra.

Los EIA en “sándwich” de tercera generación usa antígenos recombinantes en fase sólida, los anticuerpos específicos se unen al antígeno, la unión antígeno – anticuerpo se detecta añadiendo un antígeno conjugado a una enzima que al reaccionar con el sustrato produce una reacción de color, el cual es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en la muestra. Estos ensayos proveen mayor sensibilidad para la detección temprana de la infección debido a la habilidad para detectar anticuerpos IgM, y son menos costoso.

Los EIA en captura (GACELISA) es un test versátil altamente sensible por su capacidad de detectar bajas concentraciones de anticuerpos, es el método preferido para muestras de orina o fluido oral.

La sensibilidad y especificidad de los EIA están entre 98.1% y 100% cuando son comparados con los ensayos confirmatorios (Western-blot).

Aunque los EIA son altamente sensibles, pueden ocurrir resultados falsos negativos y falsos reactivos:

Falsos Negativos:

- Etapa de seroconversión, esta puede ir desde dos semanas después de la infección hasta 2 a 3 meses, en algunos casos inusuales hasta después de los 5 meses o más tarde en individuos inmunocomprometidos.
- La mayoría de los EIA detectan con más sensibilidad las inmunoglobulinas de tipo IgG y pueden producir falsos negativos después del comienzo de la respuesta inmunológica en el período de producción de anticuerpos de tipo IgM.
- En personas infectadas con cepas altamente divergentes a la cepa VIH1 clasificadas como subtipo O, sin embargo hoy en día la mayoría de los Kit detectan este subtipo.

Falsos Reactivos:

Pueden ocurrir y causar considerable ansiedad si estos resultados se reportan al paciente independientemente del test confirmato-

rio. En general, la probabilidad de que un resultado EIA sea falso positivo está inversamente relacionada con la intensidad de la reacción. En poblaciones con baja prevalencia, el 86.7% de los sueros fuertemente reactivo reportaron el Western-blot o el cultivo de virus positivo. Por otra parte, los sueros moderadamente reactivo por los EIA fueron positivos por el Western-blot o por cultivo de virus sólo en el 1.9% de las veces. La mayoría de los falsos reactivos se deben:

- Errores técnicos asociados con la realización del test: p.ej. fallas en la colocación de las muestras en la placa, contaminación de los pozos con muestras positivas, entre otras
- Mal funcionamiento de los lavadores de tipo automático.
- Sueros tratados por calor, lipémicos y sueros hemolizados.
- Se ha reportado falsos reactivos en 19% de pacientes hemofílicos, 13% de los pacientes alcohólicos con hepatitis, 4% de pacientes hemodializados y 24% de los pacientes con un test VDRL reactivo.
- En pacientes con múltiples transfusiones sanguíneas.

Otros tipos de test de screening son los métodos rápidos:

1. Ensayo de Aglutinación

Estos no tiene licencia por el FDA pero son ampliamente usados en Asia, Australia, América Latina y Africa. La complejidad de estos ensayos es comparable a los EIA excepto que no requieren aparatos de lectura, se usan para estudios de seroprevalencia en laboratorios alejados o aislados de los centros de referencia y que controlan un bajo volumen de población. El costo es comparable a los EIA y son menos sensibles y específicos.

2. Test de Aglutinación en partículas de Latex:

No es de amplia aceptación debido a su costo, dificultad para la lectura, y su menor sensibilidad y especificidad comparado con los EIA.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

Por razones ya mencionadas y a las considerables implicaciones psicológicas y sociales de un falso reactivo, es inapropiado tomar decisiones médicas solamente con resultados de las pruebas EIA. A todas las muestras con resultados EIA reactivas se les deben realizar los test confirmatorios respectivos.

Ensayo Confirmatorio o Suplementario

Son altamente específicos y se usan para confirmar todos los ensayos iniciales que den resultados reactivos.

1. Western-blot (WB):

Es el método confirmatorio más ampliamente usado y consiste en tiras de nitrocelulosa con las proteínas de virus separadas según su peso molecular. El virus concentrado y parcialmente purificado es degradado y sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida y seguidamente electrotransferido a papel de nitrocelulosa. La reacción para detectar la presencia de anticuerpo es similar a otros métodos inmunoenzimáticos. La lectura de las tiras de WB se basa en la observación de las bandas características. Estas bandas son: proteínas de envoltura (env): gp160, gp120, gp41; proteínas de la polimerasa (pol): p66, p51, p31 y proteínas de core (gag): p55, p24, p17^{1,2}.

La mayoría de los reportes indican que los anticuerpos para las proteínas de la región (gag) son las primeras que aparecen después de la seroconversión, éstas pueden disminuir, persistir o llegar a ser indetectables con el comienzo de los síntomas. Los anticuerpos a la glicoproteína de transmembrana (gp 41) puede ser detectada en todas las personas infectadas independiente del estadio clínico.

El criterio de interpretación tiene énfasis sobre la presencia de patrones positivos de anticuerpos contra la región de glicoproteínas de la región (env) y la proteína p24 de la región (gag).

La selección del criterio de interpretación es complicada por la especial necesidad de pruebas en diferentes situaciones y la necesidad

de aplicar un criterio de interpretación simple en cada caso. Cuando la población de estudio es de alto riesgo (usuarios de drogas intravenosas u homosexuales) es importante que el criterio de positividad sea amplio en la etapa temprana de la infección, cuando sólo pocas bandas estén presentes; si la prevalencia de la infección es alta, el valor predictivo de patrones de pocas bandas es alto. En una población con baja prevalencia (donadores de sangre) es considerable utilizar un criterio más exigente ya que en esta población un patrón de pocas bandas en WB tiene un más bajo valor predictivo.²

La selección del criterio de interpretación es más complicado en poblaciones donde están presente el VIH1 y VIH2.

En la siguiente tabla podemos observar algunos criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Control Disease Center (CDC) y la Federal Drug Administration (FDA):

Organización	Criterio + VIH1	Criterio + VIH2
CDC	Dos bandas cualquiera de: p24, gp41, gp120, gp160	
FDA	P24, p31 y gp41 o gp120-160	
OMS	Dos bandas de env con o sin bandas de gag o pol	Dos de env con o sin gag o pol

Cuando no se presente estos patrones deberá considerarse el WB indeterminado, estos ocurren frecuentemente en personas que no están infectadas con VIH, patrones de bandas del gag p24 y p17 son las más comunes, aparecen en 10% a 15% de personas que no están infectadas.

Personas con patrones de WB indeterminados que permanecen estables por meses o años probablemente no están infectados, se sugiere que personas sin factores de riesgos para la infección pero con persistentes y estables patrones de WB indeterminados, deben ser monitoreadas a los 6 meses, si no desarrollan bandas adicionales estos pudieran corresponder a que no están infectados y se pueden recurrir a las pruebas moleculares

donde se hace la detección directa del genoma viral.³

EL WB presenta algunas desventajas como: ser una prueba relativamente lenta, cuidadosa de realizar y subjetiva en la lectura de resultados.

2. Ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

Los ensayos de IFI, ofrecen un método alternativo que ha demostrado ser tan sensible y específico como el WB. Se basa en el uso de células infectadas que son fijadas a un portaobjetos, utilizando como control células no infectadas del mismo origen. El suero problema es incubado para reaccionar con los antígenos presentes en las células infectadas y su presencia se demuestra por medio de un antisuero anti IgG humano marcado con un fluorocromo. La lectura de resultado se realiza con un microscopio de fluorescencia. La IFI es una técnica rápida, económica y fiable, su mayor limitación está en la subjetividad de interpretación de la lectura de la lámina.

3. La Radioinmunoprecipitación (RIPA):

Es una técnica de confirmación compleja, ya que para llevarla a cabo es necesario utilizar cultivos celulares, replicar el virus, marcar con isótopos, inmunoprecipitar, correr electroforéticamente en gel de poliacrilamida y finalmente, mediante autoradiografía detectar las bandas. El patrón es similar al WB pero, en este caso, las glicoproteínas de alto peso molecular son detectadas, en su estado soluble, con una mayor sensibilidad.

Esta técnica es demasiado laboriosa y costosa, se usa para investigación. Puede usarse en caso de WB indeterminado ya que es más sensible para detectar anticuerpos contra la glicoproteína de env.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

Muestras utilizadas para las pruebas serológicas

- Suero o plasma: las muestras pueden ser enviadas desde el interior del país a una temperatura de 4°C en un período de 48 horas, o a -20°C si se requiere de un

mayor tiempo de transporte. Es el tipo de muestra más ampliamente utilizada en los distintos laboratorios.

- Sangre fresca sobre papel de filtro: se ha usado para screening de recién nacidos. Se usa en caso donde la recolección y el almacenaje del suero o plasma se dificulta o es imposible. Las muestras pueden ser guardadas al menos 45 días a temperatura ambiente, aún en áreas tropicales, sin perder la sensibilidad. Para almacenajes a largo plazo, las muestras deben ser guardadas en un recipiente con un desecador a -20°C. La desventaja es que las muestras deben ser tomadas en forma fresca, segura y uniforme, el círculo del papel debe estar saturado con la muestra.
- Fluido Oral: Ha sido propuesto como una alternativa no invasiva para medir anticuerpos a una gran variedad de agentes virales, sin embargo tiene muchas desventajas: (a) no hay ningún test de este tipo aprobado de manera internacional (p.ej. FDA), (b) algunos fluidos orales no contienen suficientes concentraciones de IgG para la sensibilidad del test y (c) Finalmente, el uso del fluido oral puede ser de alto riesgo para la exposición de ciertos agentes infecciosos tales como el *Mycobacterium*.
- Orina: Semejante al fluido oral ha sido propuesto como una alternativa no invasiva y las desventajas son las mismas que la enunciadas para el fluido oral.

Otras técnicas serológicas han sido desarrolladas con el propósito de resolver problemas diagnósticos como los que se producen con niños menores de 15 meses nacidos de madres seropositivas. En estos casos, debido a la presencia de anticuerpos maternos en la sangre de los niños, son prácticamente inútiles las técnicas habituales de detección de anticuerpos. Estos métodos nos permiten detectar la producción *in vitro* de anticuerpos a partir de los linfocitos de sangre periférica de los niños infectados (IVAP, ELISPOT) donde los linfocitos del niño son separados de la sangre completa, lavados y en un medio de crecimiento son estimulados para producir anticuerpos con cualquier mitógeno, los linfocitos B sensibilizadas al VIH producirán anticuerpos que se liberarán en el

sobrenadante del cultivo y que podrán ser detectados usando los métodos estándar. Sin embargo, estas pruebas pueden producir una proporción importante de resultados falsos positivos y falsos negativos.

1. Falsos Positivos:

Se han reportado en infantes no infectados durante los primeros 2 meses de vida debido a anticuerpos anti HIV maternos adheridos a las células B del infante en el cultivo.

2. Falsos Negativos:

Se han reportado en niños y adultos infectados – HIV con inmunodeficiencia avanzada quienes no pueden producir anticuerpos o en aquellas con infección latente que no tienen una replicación viral activa. La replicación activa de virus es el estímulo para la replicación de las células productoras de anticuerpos. La supresión de la replicación viral por mecanismos inmunes o por terapia antiviral puede suprimir la producción de anticuerpos por debajo de los niveles de detección.

Detección de proteínas vírales (antígenos virales)

Detección del antígeno p24

El primer uso para la detección de antígenos virales del VIH fue para monitorear el crecimiento del virus en los cultivos celulares. Se realiza mediante una técnica inmuno-enzimática y determina un antígeno del core: la proteína p24 en suero, plasma y líquido cefaloraquídeo.^{2,3}

Se utilizan dos sistemas ELISA de captura, el clásico sandwich o el competitivo. Estas pruebas ayudan a medir el grado de replicación vírica en los fluidos corporales.

El límite de la prueba es que detecta antígeno p24 libre en suero y plasma. Desafortunadamente, la mayoría del antígeno p24 presente después de la seroconversión existe como un complejo antígeno-anticuerpo y no es detectado con los Kits comerciales. Sin embargo, recientemente, se ha introducido una modificación del ensayo en donde se utiliza

un reactivo ácido que disocia estos complejos mejorando la sensibilidad de los mismos.⁴

Hoy día estos ensayos se utilizan para: (a) determinar la evolución de la infección, (b) diagnóstico en niños y en adultos en período de ventana inmunológica, (c) como factor de pronóstico de enfermedad y (d) para medir replicación viral en cultivo.

Aislamiento del Virus

El aislamiento del VIH se puede realizar a partir de células procedentes de individuos infectados o a partir de fluidos acelulares, así como del plasma. Estas células o fluidos son puestas en contacto con células susceptibles que facilitan la replicación vírica y por tanto su aislamiento. Existen diversas líneas celulares sensibles a la replicación viral, pero son los linfocitos de sangre periférica de individuos seronegativos estimulados con mitógenos, los que muestran una mayor sensibilidad para el aislamiento del virus.¹

Habitualmente, el aislamiento del virus se realiza a partir de linfocitos periféricos obtenidos de sangre total de la persona infectada, utilizando para su separación gradientes de Ficoll-Hypaque y posterior centrifugación. Cuando el cocultivo se realiza con linfocitos normales de sangre periférica, el donante deberá carecer de anticuerpos frente al VIH y al virus de la hepatitis B.

La demostración de la presencia de virus en cultivo, se puede establecer por diversos métodos:

- a. Observación directa mediante el microscopio óptico para detectar el efecto citopático, que consiste en células multinucleadas gigantes y muerte celular.
- b. Detección de antígenos en las células mediante la técnica IFA.
- c. Detección de antígenos p24 en el sobrenadante de los cultivos mediante la técnica de ELISA.
- d. Determinación de la actividad de la enzima transcriptasa reversa.
- e. Detección de ADN proviral o ARN viral mediante las técnicas de hibridización o PCR.

- f. Detección de las partículas virales mediante tensión negativa y visualización por microscopía electrónica.

Aunque el aislamiento del virus es pobre para ser usado como diagnóstico por su relativa insensibilidad, alto costo y requiere de un enorme tiempo para su realización, los cultivos sirven como estándar para otros test diagnóstico que han sido establecidos. Además, sirven para identificar nuevas variantes virales, en el diagnóstico en niños y en adultos en período de ventana.

DETECCIÓN DIRECTA DEL VIH UTILIZANDO TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Aunque las partículas virales infecciosas del VIH encapsidan dos cadenas simples de ARN como información genética, en su ciclo de vida incluye una conversión a doble cadena de ADN denominado provirus, el cual se integra dentro de los cromosomas de la célula huésped.^{5,6}

Debido a la baja frecuencia de células mononucleares periféricas infectadas con el VIH1 en una persona seropositiva, las técnicas de biología molecular convencionales no son lo suficientemente sensibles para detectar y caracterizar el ADN proviral directamente de linfocitos de pacientes. Por lo tanto este ADN debe ser primero amplificado para obtener niveles detectables utilizando la técnica del PCR.⁶

Para el estudio de la infección por VIH, el PCR ha demostrado tanto utilidad clínica como de investigación:

- Detección directa y cuantificación del ADN-VIH de células de personas infectadas.
- Detección en personas infectadas durante el período de ventana (antes de la generación de anticuerpos específicos para el VIH).
- Para resolver el estatus de infección de individuos con WB indeterminado.

- Para diagnóstico en neonatos de infección por VIH.
- Para diferenciar infección entre VIH1 y VIH2.
- Para definir patrones de transmisión y evolución del virus a través de las poblaciones.

El método de amplificación de ADN PCR, utiliza dos oligonucleótidos (primers) de secuencia conocida separadas por unas 10 a 300 bases y que son complementarias a las bandas del ADN diana. Tras la desnaturalización del ADN y anillamiento de los primers tiene lugar la incorporación de deoxinucleósidos trifosfato mediante la intervención de una enzima. Puesto que las bandas recién sintetizadas de ADN pueden servir como moldes por si mismas, la repetición de ciclos de desnaturalización, anillamiento y alargamiento da lugar a un crecimiento exponencial de copias de la región flanqueada por los primers. El ADN vírico amplificado por este procedimiento puede ser detectado por hibridación o por una corrida electroforética en gel de agarosa. Este método permite la amplificación de las regiones del genoma vírico más de 100.000 veces. La técnica puede ser realizada en 2 días.

Para determinar ARN VIH circulante se usa la metodología de PCR ARN (RT PCR), donde hay un paso previo de copiar ADN del ARN usando la enzima transcriptasa reversa antes de la amplificación del ADN.

PCR in situ, ha sido usada para la detección directa del ADN proviral de tejido fijado en formalina. Sin embargo una limitación ha sido la imposibilidad de localizar ADN amplificado en células o secciones de tejido. Esta limitación ha sido solventada utilizando una combinación de PCR con hibridización in situ. Esta técnica permite la localización de segmentos de ADN amplificados específicos dentro de células aisladas y secciones de tejido.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO EN INFANTES HIJOS DE MADRES SEROPOSITIVAS

Debido a que los anticuerpos maternos tipo IgG-VIH, pasan la barrera transplacentaria virtualmente todos los recién nacidos hijos



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

Algoritmo usado para la detección de la infección por el VIH usando técnicas serológicas

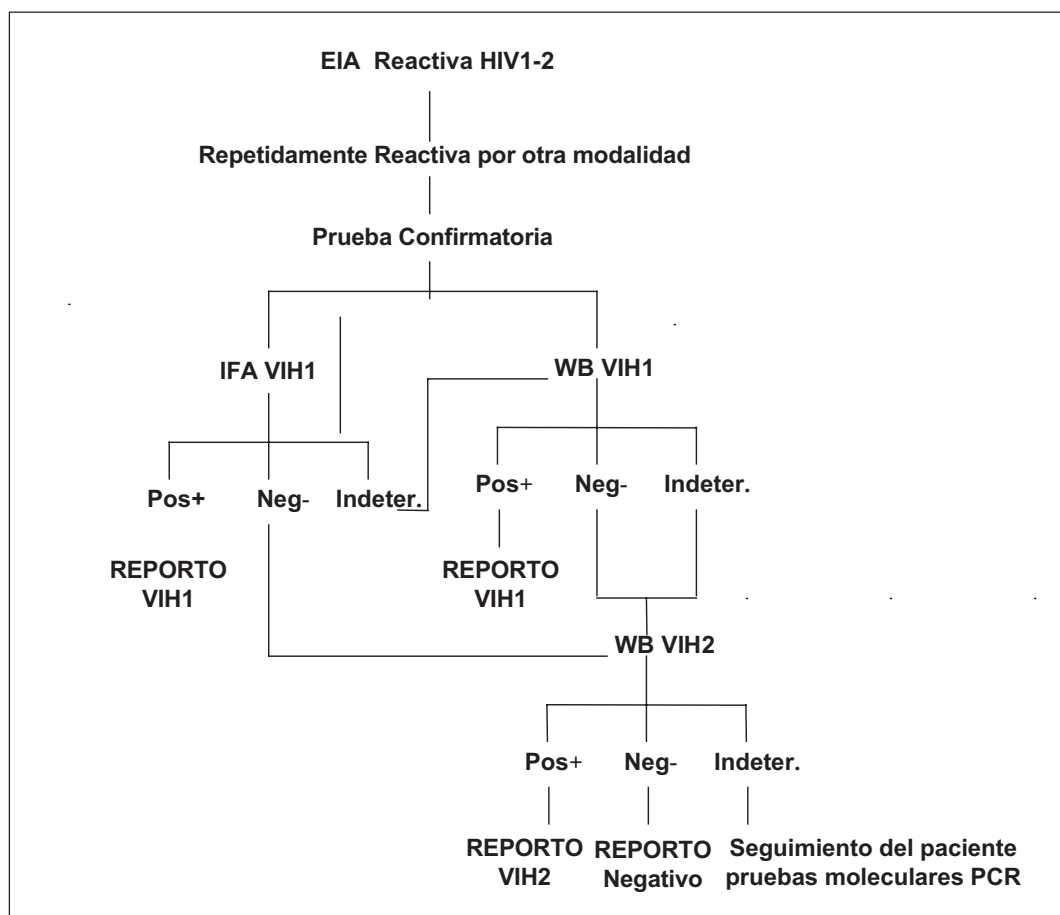


Figura 1.

de madres seropositivas tienen la presencia de anticuerpos, lo cual no necesariamente indica infección por el virus. Estudios han demostrado que acerca del 20% al 30% de recién nacidos adquiere la infección por el VIH, sin embargo hoy día con el uso de tratamiento antiretroviral, se ha reducido a un 8% la transmisión, mientras que el 100% de estos niños dan resultados para ensayos EIA o WB positivos, estos anticuerpos maternos pueden persistir hasta los 15 a 18 meses de edad. Los métodos estándar de EIA y WB la mayoría detectan eficientemente IgG y no pueden diferenciar anticuerpos maternos del infante¹.

Sin embargo, se ha sugerido para resolver este problema: observar la aparición de nuevas bandas en los ensayos de WB en muestras obtenidas durante el primer año de vida.

Nuevas bandas indicarán producción de anticuerpos por el infante y así, la presencia de infección. Sin embargo, esto no aparece sino muchos meses después.

También se ha usado monitorear el título de anticuerpo durante el primer año de vida. Un aumento de título indicará producción de anticuerpos y así infección, y una caída de título de anticuerpo indicará no infección. Aunque teóricamente aplicable para el VIH hay estudios que muestran que el título de anticuerpos medido por la lectura de densidad óptica de los EIA no siempre se correlaciona con el estatus de infección del infante. Ensayos de IgM e IgA específica para VIH no son usados rutinariamente. En la figura 2 se muestra el algoritmo de diagnóstico corrientemente usado para la infección del VIH en los niños hijos de madres seropositivas.

Algoritmo de Diagnóstico para infantes hijos de madres infectadas con el VIH

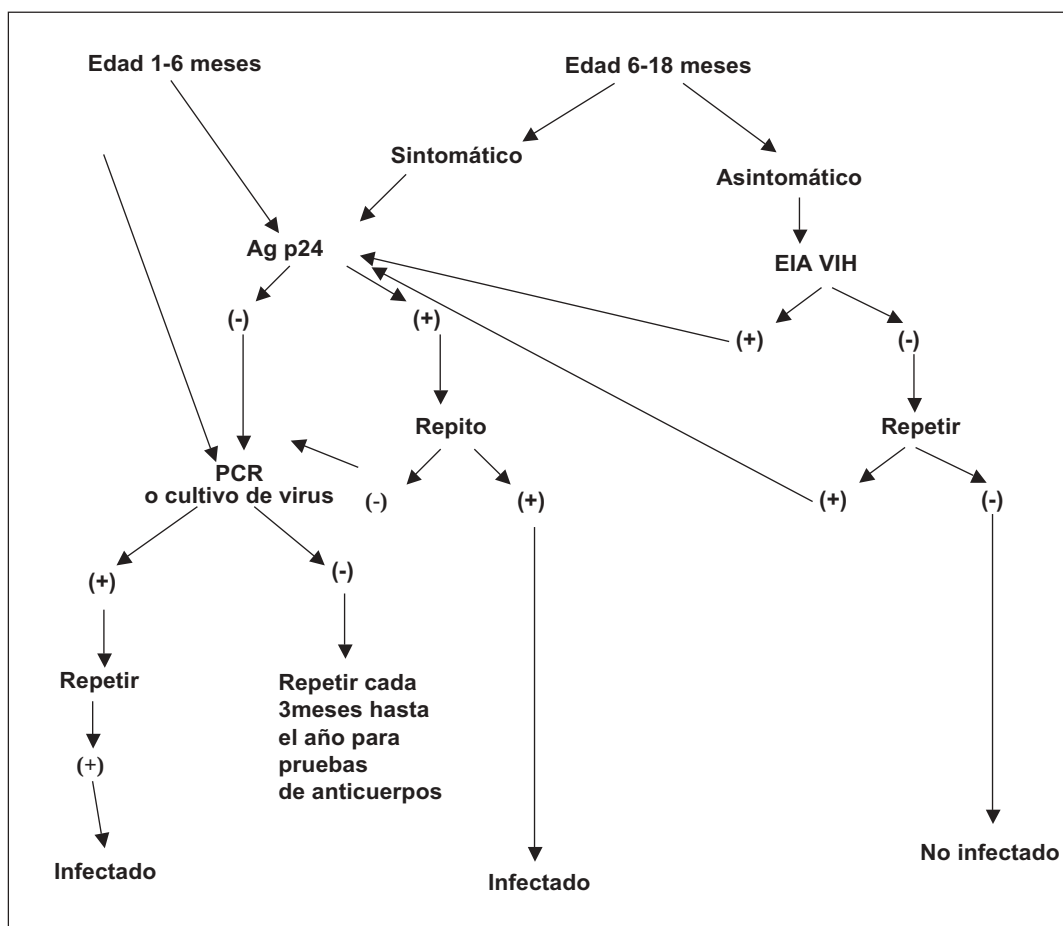


Figura 2.

Para niños de 1 a 6 meses de edad, el PCR y el cultivo de virus son recomendados debido a su gran sensibilidad para esta edad. Los ensayos de antígeno p24 es otra opción, particularmente en niños de 3-6 meses de edad ya que este test tiende a dar falsos negativos en infantes por debajo de 3 meses. Los ensayos de producción de anticuerpos *in vitro* no se usarán para el diagnóstico en niños por debajo de 2 meses de edad.

Para niños de 6-18 mese de edad un ensayo de anticuerpo estándar inicial debe realizarse para determinar si hay seroreversión (pérdida de anticuerpos maternos). Si el test de anticuerpos es negativo y repetidamente probado, este niño debe ser considerado no infectado a menos que posteriormente revele otros signos o síntomas de infección por VIH. Niños de 6-18 meses con ensayos de anti-

cuerpos positivos serán probados con otros ensayos como se indica en el algoritmo. Hasta que estos ensayos para el diagnóstico temprano nos den un resultado firmemente establecido, deben ser repetidos y de ser posible otros test deben ser utilizados para confirmar el diagnóstico.

DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL

Tras la seroconversión, los pacientes infectados suelen pasar a una fase asintomática que puede durar varios años. Este período se caracteriza por una escasa viremia persistente y una disminución progresiva del número de linfocitos T CD4+, que origina una situación de inmunodeficiencia grave, múltiples infecciones oportunistas, tumores malignos y por último, la muerte. Aunque la cantidad de vi-



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

rus en la sangre periférica es relativamente pequeña durante la fase asintomática de la infección, los procesos de replicación y eliminación del virus parecen ser procesos dinámicos en los que una elevada tasa de producción de virus e infección de los linfocitos CD4+ se ve equilibrada por una tasa igualmente alta de eliminación vírica, muerte de las células infectadas y reposición de linfocitos CD4+ lo cual se traduce en el mantenimiento de niveles relativamente estables tanto de viremia como de linfocitos CD4+. ^{7,8,9,10}

Las determinaciones cuantitativas de la viremia han puesto de manifiesto que el aumento en el número de virus en sangre periférica podría estar relacionado con un mayor riesgo de progresión clínica de la infección por el VIH, mientras que el descenso de la viremia podría asociarse a un menor riesgo de progresión clínica. La cantidad de virus en sangre periférica puede cuantificarse de varias formas:

- a. Determinación de antígeno p24 de VIH en suero
- b. Cultivo cuantitativo del VIH a partir del plasma
- c. Determinación directa de ARN vírico en el plasma, mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos o amplificación de señales.

Las pruebas EIA para determinar antígeno p24 libre como marcador de la cantidad de virus es limitada, ya que este antígeno sólo es detectable en el 20% de los pacientes asintomáticos y en torno al 40% a 50% de los pacientes sintomáticos.

La utilidad de los cultivos cuantitativos es escasa para monitorear la viremia en los pacientes infectados por el VIH, ya que sólo una pequeña parte de las partículas víricas son infecciosas *in vitro*. A menudo, los virus infecciosos resultan indetectables en los pacientes asintomáticos.

Las técnicas con mayor sensibilidad y especificidad para cuantificar el ARN del VIH son las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos o amplificación de señales¹¹. Estas pruebas pueden utilizarse junto a los datos clínicos y otros marcadores analíticos, como un indicador de pronóstico de la enfermedad, como

medida basal en el inicio de tratamiento, de ayuda para valorar el cambio de los valores plasmáticos del ARN del VIH como marcador indirecto de la respuesta vírica al tratamiento antiretroviral, también puede utilizarse para pronosticar la eficacia a largo plazo del tratamiento antiretroviral en los ensayos terapéuticos y en los programas individuales de tratamiento, como factor pronóstico y de tratamiento en la transmisión vertical de madre a hijo.¹¹

La carga viral se refiere a una medida del número de copias de ARN del VIH por volumen de plasma (ml).

Hay tres metodologías de laboratorio que han sido desarrolladas para las pruebas:

1. La reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (RT-PCR), donde hay amplificación del ARN, método de Amplicor ROCHE.
2. Quantiplex, denominada bDNA o cadena ramificada de ARN-CAIRON
3. Amplificación NASBA basada en secuencia de ácidos nucleicos-ORGANON

Los resultados se expresan en copias de ARN por mililitro de plasma y su logaritmo.

Las tres tienen un método estándar con una sensibilidad entre 400 y 750000 copias por mililitro de plasma y el método ultrasensible entre 50 y 50000 copias por mililitro de plasma.¹² Es recomendable usar siempre la misma metodología para el seguimiento de los pacientes.

El algoritmo para utilizar estos dos métodos es el siguiente:

- a. Método estándar :
 - para pronóstico de la infección
 - como medida basal para comienzo del tratamiento antiretroviral
 - para seguimiento inicial después del tratamiento
- b. Método Ultrasensible:
 - Cuando por el método estándar da 5000 copias o menos
 - Para seguimiento del tratamiento

Es esencial establecer un nivel basal de la carga viral. Se consigue este nivel estableciendo un promedio de los resultados de dos prue-

bas separadas por 2 a 4 semanas. El nivel basal de ARN de VIH sirve como un nivel contra el cual se pueden comparar resultados futuros, para tomar decisiones sobre el tratamiento a seguir y para cambios de tratamientos, ya que se deben de basar en un incremento sostenido de la carga viral y no sobre un resultado único. Ciertos cofactores, como las inmunizaciones contra la influenza, brotes del herpes simple y otros, incrementan transitoriamente los niveles de VIH en la corriente sanguínea. Por estas razones los pacientes no deben someterse a la prueba de la Carga Viral por 4 a 6 semanas después de experimentar uno o más de estos eventos. Debe considerarse hacerse una prueba de la carga viral cada 3 a 4 meses para confirmar que los medicamentos antiretrovirales estén haciendo su efecto. Al evaluar los resultados de la carga viral es importante anotar que sólo los incrementos o las reducciones en 0.5 log o más son considerados como cambios significativos que podrían ameritar cambios en el régimen antiviral¹³.

Interpretación de los Resultados

1. Carga viral alta mayor de 100 mil copias: esto indica un riesgo más alto para la progresión de la enfermedad.
2. Carga viral baja menor de 10 mil copias: este resultado indica que el riesgo de la progresión de la enfermedad es relativamente baja en el futuro cercano.
3. Una carga viral indetectable menos de 50 copias: no significa que la infección del VIH se ha curado, sino que la prueba no es lo suficientemente sensible para encontrar cantidades más pequeñas de virus en plasma.

Nota: La carga viral sólo mide la cantidad de ARN viral en plasma no así en los santuarios del virus y en otras células.

Tipo de muestra: plasma, separado de la sangre total, tomado con EDTA con un tiempo no mayor de 4 horas de separado, mantenido el plasma hasta 4 días a 4°C y si es mayor tiempo a -20°C.

Debido a la alta diversidad de cepas divergentes del VIH a la aparición de variantes

resistentes a las drogas, virus con resistencia preexistente, es necesario, en un futuro inmediato, los estudios de genotipo y fenotipo para tomar decisiones relacionadas al tratamiento y ayudar así a mejorar sustancialmente las posibles fallas de la terapia.

USO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ENUMERAR POBLACIONES DE LINFOCITOS EN LA ENFERMEDAD DEL VIH

La determinación de células T en pacientes infectados por VIH1 se conoce con el nombre de inmunofenotipo. El inmunofenotipo combina el uso de anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo (identifica población de células) y el citómetro de flujo (evalúa estas células individuales rápidamente en un análisis multiparamétrico correlacionado).¹⁴

La sangre completa anticoagulada se combina con anticuerpos monoclonales específicos para antígenos celulares de interés e incubados, permitiendo que la reacción antígeno-anticuerpo tenga lugar. Las células rojas son lisadas, y las muestras entonces son introducidas en el citómetro de flujo y analizadas por patrones de fluorescencia.¹⁵

La muestra más recomendada: sangre completa tomado en tubo con EDTA, puede ser conservada a temperatura ambiente hasta 24 horas.

La razón primaria para el inmunofenotipaje de pacientes con infección por VIH es el conteo de linfocitos T CD4+. Una de las primeras anormalidades encontradas en lo que nosotros conocemos como SIDA es la disminución en el porcentaje y número absoluto de células T CD4. Esta disminución es progresiva a través de la infección¹⁶. Las células T CD4+ son importantes en la inmunidad celular y en la humoral; ellas inducen células efectoras a realizar sus funciones inmunológicas, las cuales incluyen: producción de anticuerpos, hipersensibilidad de retardada e inmunidad mediada por células. La disminución de estas células en la infección por VIH, se correlaciona *in vivo* con la disminución de las respuestas a reconocer antígenos y con una incrementada susceptibilidad a infecciones oportunistas y sarcoma de Kaposi. *In vitro*, la



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

disminución de la respuesta a los mitógenos y antígenos se correlaciona con una disminución del número de células T CD4. La citotoxicidad celular mediada por células (T CD8+) se incrementa tempranamente en la infección por VIH, pero durante el último estadio de la enfermedad esta respuesta está disminuida. La producción de anticuerpos (por células B) se incrementa durante la infección temprana propia de la activación policlonal de las células B, pero aún esta respuesta disminuye con la progresión de la enfermedad.

Estudios clínicos tempranos sobre la relación de CD4-CD8, el cual es un número derivado de dividir el porcentaje de CD4 por el porcentaje de CD8, debido a la gran afluencia de células CD8 hay una disminución del radio en el estadio temprano de la infección, por lo que el uso de éste no es de mucho valor. La mayoría de los clínicos se interesan más en el número y porcentaje de células CD4 como un indicador de inmunosupresión. De otro lado, las células T CD8 pueden tener un papel protector en el período temprano de la infección, en el estadio de SIDA las células T CD8+ disminuyen significativamente.

Las células TCD4 + han sido utilizadas como marcadores inmunológicos en la infección por VIH. Los resultados son expresados como el porcentaje de células mononucleares de sangre periférica que son CD4+. En personas no infectadas por VIH aproximadamente el 20 al 40 % de células T son CD4+. El porcentaje de células TCD4+ es multiplicado por la cuenta absoluta de linfocitos y se obtiene el número total de células T ayudadoras. Este valor es usualmente de 500 a 1500 células por mm³ en ausencia de infección por VIH.

LA VARIACIÓN DE CÉLULAS TCD4+

La variabilidad diaria e interlaboratorio de este parámetro es considerable, debido a las fluctuaciones de la cuenta de células blanco en la sangre y a la cuenta diferencial de leucocitos, por esta razón algunos autores se han inclinado por el uso del porcentaje de las células TCD4+ más que por los valores absolutos. El porcentaje de células TCD4+ es algunas veces más exacto y reproducible, los dos índices son clínicamente intercambiables pero

la cuenta absoluta de células TCD4+ tiene un uso más amplio.

La subpoblación de CD4 y CD8 han sido enumeradas usando inmunofenotipaje de 2, 3 y 4 colores para ayudar a determinar si hay una subpoblación de estas células que es importante en la progresión de la enfermedad. Se ha encontrado una disminución de las células B y NK en la infección por VIH, de valor clínico y predictivo en estudio.

LIMITACIONES DE LA CUENTA DE CÉLULAS TCD4+ COMO MARCADOR CLÍNICO

Las características de la infección por VIH hacen de esta enfermedad una excelente candidata para la aplicación de marcadores clínicos en el manejo de pacientes, en la práctica médica y en la toma de decisiones.

La cuenta de células TCD4+ cae invariablemente con la progresión por la infección por VIH, de allí que cualquier tratamiento, el cual resulte en un incremento en la cuenta de células TCD4+ debe, en teoría, ser asociado con mejoría clínica.

Cambios en las células TCD4+ en pacientes asintomáticos durante tratamiento, han mostrado correlacionar significativamente con progresión de la enfermedad y sobrevida. Sin embargo la cuenta de células CD4+ parece ser un marcador incompleto de respuesta a la terapia y mejoría clínica.

Una de las limitaciones de utilizar la cuenta de células TCD4+ como un verdadero marcador clínico es la carencia de un rango normal preciso. Las variaciones diurnas y otros factores no relacionados con la infección por VIH, los cuales, se sabe afectan la cuenta de células TCD4+, por ejemplo, edad mayor de 60 años, la raza asiática, nutrición protéica deficiente, ejercicio e infección pueden independientemente causar disminución de estas células TCD4+. Otros factores como la ansiedad producen aumento, además, ensayos estándares para medir la cuenta de células TCD4+ pueden mostrar variaciones intraensayos de un 10%. Todo esto establece claras limitaciones para utilizar el número de células TCD4+ como un marcador clínico ideal en la infección por

VIH. A pesar de todas estas limitaciones en la determinación de células TCD4+, estudios indican que los niveles de ARN-VIH constituyen un fuerte marcador de progresión temprana en la infección, pero cuando aumenta el tiempo con la infección por VIH, marcadores como la cuenta de células TCD4+y la función de las células T gana poder predictivo. En los últimos estadios de la infección, la medida de la deficiencia inmunológica puede ser un marcador más poderoso de pronóstico que las medidas de marcadores virológicos como la carga viral.

Esto es consistente con la hipótesis de que la replicación viral es el principal factor que lleva a destrucción de las células TCD4+ y a fallas funcional de estas células, lo cual hace al paciente vulnerable a infecciones oportunistas y malignidades relacionadas con el VIH. Así la determinación de ARN-VIH, en los últimos estadios de la infección debe estar relacionada con el estado inmunológico del paciente indicando que el manejo adecuado requiere la combinación de la evaluación de niveles ARN-VIH, cuenta de células TCD4+ y la activación de las células T.

PANEL DE ANTICUERPOS BÁSICOS RECOMENDADOS PARA LA EVALUACIÓN EN LA INFECCIÓN POR VIH

El Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los E.U.A División de SIDA (NIAD DAIDS) recomienda para los estudios clínicos de SIDA el siguiente panel de anticuerpos: CD14 y CD45; control isotópico; CD3/CD4 y CD3/CD8. El CD19 es recomendado para muestras pediátricas. Para el grupo de estudios clínicos (ACTG) de este Instituto el marcador más importante es la cuenta de células TCD4+. Hoy en día ha adquirido importancia el estudio de células TCD8 y sus marcadores de activación.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

REFERENCIAS

1. Schochetman G., Richard J. AIDS TESTING. Center for Disease Control and Prevention. Second Edition. 1994.
2. A. García Sáiz. Diagnóstico Viroológico en la infección producida por el VIH. Revisión. Publicación oficial de la Sociedad Interdisciplinaria de SIDA. Vol 1, N° 2 : 41-45; 1990.
3. Center for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS Surveillance Report. Atlanta: CDC, July 1993.
4. Marcus R, CDC Cooperative Needlestick Surveillance Group, Surveillance of health care workers exposed to blood from patients infected with the Human Immunodeficiency Virus. N Engl J Med 1988; 319: 1118-1123.
5. Henry A. Erlich. PCR Technology 1992
6. Kwok, S and Sninsky, J.J 1993. PCR detection of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA sequences. In: Diagnostic Molecular Biology: Principles and Applications. Eds. Persing, D.H., Smith, F.C., Tenover, T.J., White, T.J., ASM Press, Washington, D.C.
7. BETA: Boletín de Tratamientos Experimentales contra el SIDA. La prueba de la Carga Viral del VIH. Julio 1996.
8. Jay A., Levi, MD. Human Immunodeficiency Viruses and the Pathogenesis of AIDS. JAMA, May 26. 1989. Vol 261, N° 20.
9. Wain-Hobson S. Confusión Viroológica. Reimpreso de Nature, vol 373, Enero 12. 1995.
10. David D. Ho, Avidan U. Neumann, Alan S, Wen Chen, John M. Leonard & Martin Markowitz. Recambio rápido de los viriones plasmáticos y los linfocitos CD4 en la infección por VIH-1. Nature vol. 373 Enero 12. 1995.
11. National AIDS Treatment Information Project: Las pruebas de Carga Viral. <http://www.kff.org>.
12. Sun, R, Ku, J, Jayakar, H, et al 1998. Ultrasensitive Reverse Transcription-PCR assay for quantitation of human immunodeficiency Virus type 1 RNA in plasma. Journal of Clinical Microbiology 36:2964-2969.
13. Perrin, L. 1997. Detection of low HIV-RNA levels in plasma. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14: 179-183. Loken MR, Stall AM. Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology, J Immunol Methods 1982; 50:85-112.
14. Loken MR, Stall AM. Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology, J Immunol Methods 1982; 50:85-112.
15. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Schlossman SF. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. J Immunol 1979; 123:1312-1317.
16. Simon D.W Frost, Colin A. Michie. Lymphocyte dynamics, apoptosis and HIV infection. TRENDS IN MICROBIOLOGY 77 vol 4. February 1996.
17. Shirazian D, Herzlich BC, Mokhtarian F, Spatoliatore G, Grob D. Needlestick injury; blood cells and acquired immunodeficiency syndrome. Am J Infect Control 1992; 20:133-137.