

Métodos de detección del Virus de Inmunodeficiencia Humana

Matilde Arellano Gajón

Laboratorio Clínico

Hospital Escuela de la Universidad Veracruzana

Generalidades

No existe ninguna manifestación clínica que sea característica de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 o el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida SIDA, aunque la presencia de algunas de ellas pueda sugerir en un contexto determinado la presencia de la infección, no es posible establecer un diagnóstico clínico de la enfermedad, por lo que éste sólo se puede establecer de un modo definitivo por técnicas de laboratorio. Por medio de ellas es posible detectar al propio virus o algunos de sus componentes, como proteínas y ácidos nucleicos (métodos directos, ya sea mediante cultivo vírico, detección de antígeno viral o la amplificación de una parte del material genético del virus, por ejemplo por reacción en cadena de polimerasa PCR, ADN ramificado bDNA, etcétera).

Sin embargo, la práctica habitual es detectar los anticuerpos específicos que el organismo produce como respuesta a la presencia del virus (métodos indirectos), y la mayoría de las técnicas empleadas se basan en el enzimoimmunoanálisis (ELISA o EIA) para las pruebas de escrutinio o en los inmunoblots (Western blot) para las pruebas de confirmación.

Es importante señalar que, después de la exposición al VIH, cerca de la mitad de los pacientes que se infectan desarrollan en las primeras semanas de infección (10 – 30 días) un cuadro pseudogripal que se conoce como síndrome retroviral agudo y que corresponde a las manifestaciones clínicas de la primoinfección. Aunque después de la infección el primer marcador serológico que se detecta en algunos pacientes es el antígeno p24/25, algunas semanas después aparecen los anticuerpos que se dirigen contra el VIH, en la mayoría de los pacientes infectados antes de tres meses de la exposición al virus. En los seis meses siguientes

a la infección, más del 95% de las personas infectadas presentan seroconversión (paso de seronegatividad a seropositividad) por estas técnicas. Sin embargo, el tiempo que transcurre entre la infección y la detección de la seropositividad, que también se denomina “periodo de ventana”, es variable de unos sujetos a otros y también depende de la vía de transmisión por la que se ha adquirido; así se ha visto que los sujetos que se han infectado a partir de la recepción de sangre contaminada por medio de transfusiones pueden tener anticuerpos detectables en la mayoría de los casos en 3 a 6 semanas después, mientras que en los sujetos infectados por vía sexual el periodo de seroconversión es algo más largo.

Por lo tanto, en la mayoría de los casos la seropositividad frente al VIH se detecta a partir de una extracción sanguínea con la que se realiza la determinación de anticuerpos por alguna técnica serológica. Los primeros anticuerpos que se suelen positivizar son los anti-p24/25 y anti-gp160, mientras que el resto de los anticuerpos van apareciendo de modo progresivo en las semanas siguientes. Con el desarrollo de la infección y conforme se acerca la transición a SIDA, algunos anticuerpos dejan de ser detectables y se ha descrito en adultos la completa negativización (serorreversión).

Criterios de elección de métodos de detección del VIH

A diferencia de otras enfermedades infecciosas, en las que la detección de anticuerpos refleja usualmente una exposición previa al agente patógeno y su erradicación en un tiempo pasado, en la infección VIH/SIDA la presencia de anticuerpos expresa un estado de portador del virus, y por consiguiente la posibilidad de transmitirlo a otros, aún en ausencia de manifestaciones clínicas.

La metodología EIA valora anticuerpos específicos según el antígeno que se emplee, produciéndose una reacción antígeno-

anticuerpo. Al final de la reacción, se obtiene una solución de color que se mide con un espectrofotómetro, cuya intensidad está en relación directa con la cantidad de anticuerpos en la muestra de suero del donador de sangre o del paciente.

La comercialización de las técnicas EIA para la detección de anticuerpos anti-VIH arranca en 1985 y en la actualidad se usan de un modo rutinario en los laboratorios de análisis clínicos y en los bancos de sangre o centros de transfusión de casi todos los países desarrollados del mundo. En los diferentes métodos, el antígeno puede proceder del lisado viral de un cultivo (los primeros EIA disponibles de 1ª generación) o bien proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de 10 a 50 aminoácidos específicos del VIH (EIA de 2ª y de 3ª generación). Según su diseño para reconocer la presencia de anticuerpos, se habla fundamentalmente de cuatro tipos de EIA diferentes: indirecto, competitivo, tipo sándwich y de captura. Más recientemente se han desarrollado técnicas duales que permiten la detección simultánea de antígeno y de anticuerpos frente al VIH-1 y frente al VIH-2.

Las técnicas EIA, por lo general muy sensibles, detectan mínimas cantidades de anticuerpos, por lo que pequeñas interferencias de sustancias similares podrían conducir a un resultado positivo falso. En contraposición y en la actualidad también son técnicas muy específicas, pero en la práctica se debe utilizar al menos otra técnica EIA para reafirmar la positividad, de ser posible con un diseño de reconocimiento de anticuerpo diferente; cuando la positividad se repite con un segundo EIA se confirma con técnicas de alta especificidad, como el Western Blot. Además, se suele solicitar una segunda muestra del paciente para evitar posibles equivocaciones en la manipulación de los sueros, con lo que la probabilidad de emitir resultados erróneos queda muy reducida. A pesar de todo, hay descritas posibles causas de resultados falsos positivos y falsos negativos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda tres estrategias para la determinación de Anticuerpos Anti-VIH-1/VIH-2, en los casos de resultados Reactivos. Estas estrategias son:

Estrategia I:

Ensayo innumoenzimático (EIA), más método rápido.

Estrategia II:

Realizar estrategia I más un segundo EIA con nueva muestra.

Estrategia III:

Realizar estrategia I más estrategia II más un tercer ensayo con método con diferente principio.

¿Qué hacer con un paciente con resultado reactivo?

Inicialmente deberá de valorarse de manera completa la situación clínica del paciente.

En el caso de paciente asintomático, deberá de repetirse el estudio y, en caso de ser negativo, se reportará como Negativo; en caso de ser nuevamente Reactivo, el resultado deberá ser confirmado con la prueba de electroinmunotransferencia (Western – Blot).

En caso de tener un resultado negativo o indeterminado en la prueba confirmatoria, con antecedentes de riesgo o síntomas relacionados a la infección por VIH, deberá repetirse la búsqueda de anticuerpos a los tres meses. No se reportará como Positivo hasta que esté completamente confirmado.

¿Qué hacer con un verdadero positivo?

Se considerará como paciente seropositivo aquel que presente:

Dos resultados de anticuerpos (EIA) reactivos y prueba confirmatoria incluyendo paciente asintomático que niega factores de riesgo.

Dos resultados de anticuerpos reactivos en un paciente con cuadro clínico de infección por VIH. En esta situación, no es necesario confirmar con Western – Blot.

Dos resultados de anticuerpos (EIA) reactivos y un Western – Blot negativo o indeterminado. Se deberá considerar posiblemente infectado y así se informará,

recomendándose repetir la prueba confirmatoria en tres meses.

¿Cómo comunicar el resultado al paciente?

Al notificar el resultado al paciente, la información deberá ser: personal, privada, confidencial, con información simple y concreta sobre VIH/ SIDA.

Prevención y manejo

Al hablar de prevención, se deben considerar los siguientes aspectos: disminuir el riesgo, interrumpir su propagación, brindar atención oportuna y seguimiento de los casos para evitar complicaciones, secuelas e incluso la muerte.

Lo anterior se logra con las siguientes medidas:

1.- Prevención de la infección mediante:

Reducción de la exposición al virus, promoviendo la educación sexual y aconsejando a las personas con prácticas de riesgo evitar el contacto sexual con quienes tengan posibilidades de estar afectados.

2.- Protección específica, promoviendo:

- El uso de condones.
- Reducción del riesgo con medicamentos de acción sistémica que administrados poco antes o después del coito, tienen efecto profiláctico.
- Inmunización de poblaciones expuestas. En la actualidad se ensayan vacunas en las que se emplean técnicas de ingeniería genética.
- 3.- Manejo sindromático de las enfermedades de transmisión sexual, lo cual representa actualmente una alternativa de diagnóstico y manejo en el primer y segundo nivel de atención en salud pública.
- Para evitar complicaciones, se debe dar tratamiento oportuno, realizar el seguimiento de casos sin perder el contacto con pacientes tanto sintomáticos como asintomáticos.

Prueba confirmatoria (WESTERN BLOT VIH - 1)

Las pruebas de confirmación tienen como objetivo verificar que los resultados obtenidos con las pruebas de escrutinio sean correctos.

La prueba de electroinmunotransferencia (Western Blot) es la principal prueba confirmatoria de la actualidad. Básicamente consiste en la separación de las proteínas (antígenos virales) obtenidos del cultivo del virus del VIH-1 lisados y purificados por centrifugación. La proteína viral así obtenida se coloca en un gel de poliacrilamida en forma de láminas delgadas y luego se efectúa una electroforesis, con lo que las proteínas de menor peso molecular (p17, p24) emigran más lejos en el gel, mientras que las de mayor peso molecular se mantienen cerca de su lugar de depósito. Después se transfieren a una tira de nitrocelulosa y se cortan en tiras de 3 a 5 mm de ancho.

Posteriormente, la prueba se basa en un ensayo inmunoenzimático indirecto, sobre la tira de nitrocelulosa que contiene todas las proteínas constituyentes del virus VIH-1 y un control interno Anti- IgG. Éstas son las tiras que se exponen al suero del paciente, después de una incubación se lavan y se vuelven a incubar con una IgG antihumana marcada con una enzima (conjugado), se lavan y posteriormente con la exposición de un revelador enzimático (sustrato de la enzima o cromógeno) producirá una banda coloreada (azul-violeta) en las zonas correspondientes a los anticuerpos específicos que contenga la muestra del paciente en estudio.

La banda de control interno se encuentra junto al extremo no numerado de la tira y permite validar la adición de la muestra y de los reactivos así como un buen desarrollo del método. Se debe observar cuidadosamente las tiras, ya que pueden contener un número variable de bandas; por lo tanto, debe compararse cada tira problema simultáneamente con el corrimiento de un suero control NEGATIVO y un suero control POSITIVO.

Existen diferentes criterios de interpretación del Western Blot del VIH-1 para considerarlo como positivo.

ORGANIZACIÓN	CRITERIO
ASTPHLD/CDC	Cualquiera par: p24, gp 41 ó gp120/160
FDA	Presencia de: p24 , p31 y gp41 ó Gp120/160
Standardización Serología Consortio de Retrovirus (CRSS)	Al menos dos bandas: p24 ó p31 y gp41 o gp 120/160
American Red Croos	Tres bandas, una de cada producto. Del genoma: env, gag y pol.

Las principales bandas del Western Blot y su posición correspondiente a las

masas molares de las proteínas virales se representan en la tabla siguiente:

DENOMINACIÓN	GEN	NATURALEZA	WESTERN BLOT
GP 160	ENV	Glicoproteína precursora de la GP 110/120 y de la GP 41	Banda nítida
GP 110/120	ENV	Glicoproteína de envoltura	Banda de bordes difusos.
P68	POL	Transcriptasa inversa.	Banda nítida.
P55	GAG	Precursora de las proteínas internas	Banda doble.
P52	POL	Transcriptasa inversa.	Banda nítida.
GP 41	ENV	Glicoproteína transmembranaria.	Banda difusa.
P 40	GAG	Precursora de proteínas internas.	Banda nítida.
P 24/25	GAG	Proteína interna.	Banda nítida.
P 18	GAG	Proteína interna	A veces banda doble.

INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA DE CONFIRMACIÓN WESTERN – BLOT VIH - 1

El nuevo perfil de interpretación del HIV – 1 por el grupo de estudio del

consejo de Europa y la O.M.S. considera sumamente importante ayudarse del control positivo para identificar los anticuerpos revelados, y a continuación referirse a la tabla siguiente:

INTERPRETACIÓN	PERFIL
POSITIVO	2 ENV + GAG + POL
INDETERMINADO	1 ENV + GAG + POL GAG + POL GAG POL
NEGATIVO	Ninguna banda Bandas no significativas

La calificación de indeterminado puede hacer sospechar una de las alternativas siguientes:

Seroconversión reciente (Repetir en 3 meses).

VIH – 2

Reacción cruzada con otros retrovirus.

Conclusiones

En el momento de elegir una prueba de escrutinio, debe tenerse en cuenta la sensibilidad y especificidad del método, así como también la finalidad del resultado. Si se trata de pacientes, su resultado va encaminado a la detección de la infección; si se trata de donadores de sangre, su resultado principalmente tiene como fin evitar la transmisión de la enfermedad por transfusiones de sangre contaminada, por lo cual se debe elegir un método más sensible que reduzca el periodo de seroconversión, “periodo de ventana”.

También es importante mencionar que a un resultado falso positivo se le da seguimiento con otro método, y si es necesario se realiza Western Blot, mientras que un falso negativo se reporta como “Negativo” y no se le da seguimiento.

Por lo anteriormente expuesto, se justifica plenamente la elección de un método de detección de anticuerpos anti-p24/25 y anti-p160 para banco de sangre.

Actualmente, el Banco de Sangre del Hospital Escuela de la U.V. utiliza una prueba de escrutinio EIA de 4ª generación, tipo

sándwich de dos pasos para la detección de anticuerpos VIH-1/VIH-2 (grupos M y O), en suero o plasma.

El fundamento de la técnica está basado en el uso de una fase sólida recubierta con antígenos purificados VIH-1/VIH-2 (VIH-1 gp 160 rDNA + p25 rDNA recombinante y un péptido sintético del VIH-2 gp 36). En un segundo paso, el conjugado contiene Antígeno VIH-1/VIH-2 – Peroxidasa (VIH-1 gp 41 péptido + p25 rDNA recombinante, VIH-2 gp 36 péptido; si el suero del paciente contiene anticuerpos anti-VIH-1/VIH-2, forman un complejo Antígeno-Anticuerpo-Antígeno-Peroxidasa; la presencia de la enzima inmovilizada en el complejo y la adición del sustrato reaccionan desarrollando un color; la medida de las absorbancias de las muestras y controles determina la presencia de Anticuerpos anti- VIH-1/VIH-2.

En el Banco de Sangre del Hospital Escuela, los casos reactivos se verifican llevando a cabo las estrategias I y II de la OMS, y en los casos repetidamente reactivos (**RR**) se realiza la prueba confirmatoria Western Blot.

El reporte de la prueba de confirmación (Western Blot) se entrega en un tiempo máximo de 8 días por escrito, reportando las bandas de proteínas del virus correspondientes a los anticuerpos presentes en el suero del paciente y al genoma viral, así como su interpretación, entregando conjuntamente al médico una

fotografía comparativa del control positivo, control negativo y el paciente en estudio, con la finalidad de obtener un diagnóstico oportuno y confiable (véase figura 1).

Bibliografía

1. Masci Joseph R. Primary and Ambulatory Care of the HIV- Infected Adult. Edith Mosby Year Book. New Yrok, 1992, Páginas 40 – 58.
2. Bernal Alcántara, Blanca, Hernández Tepichín, Griselda. “Las Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS): Otro reto para la prevención y control de epidemia del VIH/SIDA”. Revista de Epidemiología SSA, CONASIDA SIDA. ETS, Numero 3, Volumen 3, agosto–octubre 1997, Páginas 63 – 67.
3. Normas de Bioseguridad para Laboratorios de Diagnóstico e Investigación que trabajan con el VIH. Serie OMS sobre el Sida, 9, Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 1992, Páginas 7 – 13.
4. Norma Oficial Mexicana para la Prevención y Control del SIDA (Norma –010-SSA2-1993).

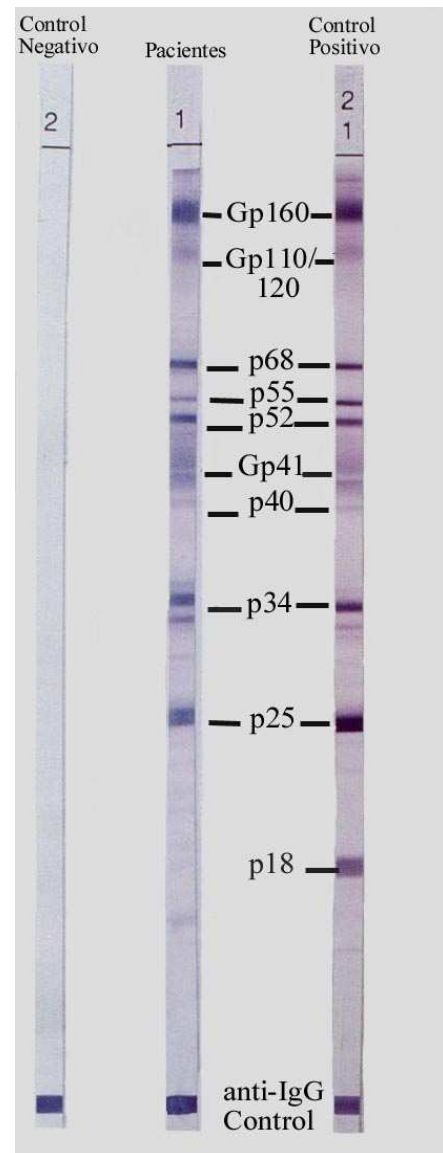


Figura 1. Fotografía comparativa de la bandas específicas con el control positivo, el control negativo y el paciente en estudio