

M.E. Hernández Rodríguez<sup>1</sup>  
E. Chimenos Küstner<sup>2</sup>  
J. López López<sup>3</sup>

## Diagnóstico de laboratorio de la infección por VIH

1 Odontóloga, Diploma de Medicina Bucal  
2 Médico estomatólogo, Profesor Titular y  
Director del Diploma de Medicina Bucal  
3 Médico estomatólogo, Profesor Titular y  
Codirector del Diploma de Medicina Bucal  
Facultad de Odontología  
Universidad de Barcelona

**Correspondencia:**

Dr. E. Chimenos Küstner  
Via Augusta 124, 1º 3ª  
08006 Barcelona

### RESUMEN

La metodología más utilizada para la identificación de individuos infectados por el VIH consiste en detectar la presencia de antígenos o de anticuerpos en el suero o en otros fluidos biológicos. Los métodos diagnósticos se dividen, por tanto, en directos (antígenos víricos) e indirectos (anticuerpos frente a dichos antígenos). Es objeto de este trabajo distinguir los diferentes métodos, en base a las distintas situaciones y a los diversos casos clínicos, teniendo en consideración su sensibilidad y especificidad.

### PALABRAS CLAVE

Infección por VIH; Diagnóstico de laboratorio; Métodos directos; Métodos indirectos.

### ABSTRACT

*The most used methods to identify individuals infected by the HIV consist on detecting the presence of antigens or antibodies in serum or other biological fluids. The diagnose methods are therefore divided into direct (viral antigens) and indirect (antibodies against these antigens). Aim of this work is to distinguish between the different methods, in consideration with their sensitivity and specificity, in different situations and clinical cases.*

### KEY WORDS

*HIV infection; Diagnose of laboratory; Direct methods; Indirect methods.*

**Tabla 1 Sistema de clasificación de acuerdo a niveles de CD4 (CDC, revisado en 1993)**

CD4	A Asintomático agudo	B Sintomático no A ni C	C Enfermedades marcadoras de SIDA
500/ $\mu$ l	A1	B1	*C1
200-499/ $\mu$ l	A2	B2	*C2
< 200 / $\mu$ l	*A3	*B3	*C3

## INTRODUCCIÓN

En el pasado, la mayoría de los pacientes con infección por VIH eran diagnosticados después del desarrollo de enfermedades específicas indicativas de inmunodeficiencia celular<sup>(1)</sup>. Dada la trascendencia epidemiológica que tiene el SIDA, cada vez es más importante establecer un diagnóstico temprano de la infección por VIH antes de su desarrollo. Actualmente, con los adelantos en el tratamiento para la infección y la prevención en la transmisión perinatal del VIH, el diagnóstico serológico basado en la detección de anticuerpos específicos contra VIH resulta primordial.

El diagnóstico de la infección por VIH solo se establece de manera definitiva mediante métodos de laboratorio, pues las manifestaciones clínicas de la infección, aunque se presenten, son inespecíficas en cualquier estadio de la enfermedad. La infección producida por el VIH-1 es considerada hoy una infección crónica; los CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) la clasificaron, en 1993, en función del recuento de las células CD4+ y en categorías clínicas. De acuerdo a estas categorías clínicas se distinguen: un grupo A con infección aguda por VIH asintomática o con linfadenopatía generalizada persistente (primoinfección); un grupo B, que presenta enfermedad sintomática por VIH; y un grupo C, con enfermedades indicadoras de SIDA (Tabla 1)<sup>(1)</sup>. Así, el espectro clínico de la infección por VIH incluye la infección primaria (síndrome retroviral agudo), la infección sintomática temprana y la inmunodeficiencia avanzada con complicaciones oportunistas. Una vez producida la infección por VIH, por algunas de las vías de contagio (sanguínea, sexual o perinatal), hay una fase deno-

minada *periodo de ventana*, de 3-6 semanas de duración aproximadamente<sup>(2)</sup>. Se caracteriza clínicamente, en un 50-70% de los casos, por un síndrome febril parecido a la mononucleosis, durante el cual no es posible detectar anticuerpos específicos, pero sí altos niveles de viremia, que pueden ser detectados tanto en cultivo viral como en pruebas de RCP (reacción en cadena de la polimerasa). Durante la infección aguda se puede detectar el antígeno p24 en el plasma. A continuación se produce la seroconversión, que es demostrada por la aparición de anticuerpos contra proteínas víricas, y comienza como una respuesta de la inmunoglobulina M (IgM) contra las proteínas Gag, con un cambio de los anticuerpos IgM por los IgG. Esto ocurre en un periodo de 2 a 41 semanas<sup>(1)</sup>. Simultáneamente a este hecho comienzan a *descender la antigenemia* (p24) y la viremia, hasta hacerse indetectables, empezando un *periodo de latencia* que puede durar años.

Al mismo tiempo surgen respuestas inmunes del huésped, aunque el ARN viral suele permanecer detectable por la RCP en la mayoría de los pacientes. No se desarrollan anticuerpos anti-VIH hasta después de la declinación de la viremia de VIH, por lo cual los ensayos serológicos no son útiles para detectar una infección aguda o primaria en este periodo<sup>(1)</sup>.

## INDICACIONES

El diagnóstico serológico, consistente en la detección de anticuerpos frente al VIH, es el enfoque primario para investigar la infección. La presencia de anticuerpos anti VIH, lejos de reflejar una exposición y

**Tabla 2** Clasificación de las técnicas de laboratorio para el diagnóstico de la infección por VIH-1<sup>(3)</sup>

**1. Métodos directos**

- Cultivo viral.
- Detección de ácidos nucleicos: PCR, LCR, Bdna, Nasba, etc.
- Antigenemia p24.

**2. Métodos indirectos**

- Detección de anticuerpos específicos.
  - Pruebas de screening: EIA, aglutinación, etc.
  - Pruebas de confirmación y suplementarias: WB, RIPA, IFI, LIA, etc.
- Investigación de la inmunidad celular específica.

*b-DNA, branched-DNA; EIA, enzimmunoanálisis; IFI, inmunofluorescencia indirecta; LCR, reacción en cadena de la ligasa; LIA, inmunoanálisis lineal; NASBA, amplificación basada en la transcripción de ácidos nucleicos; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; RIPA, análisis por la radioinmunoprecipitación; WB, Western blot.*

erradicación inmune del virus en el pasado, significa el estado del portador actual. Las pruebas de laboratorio utilizadas se clasifican en métodos directos e indirectos. Los métodos directos permiten detectar el propio virus o algunos de sus componentes, como proteínas y ácidos nucleicos, y los métodos indirectos reconocen los anticuerpos producidos por el sistema inmunitario, como respuesta a la presencia del virus (Tabla 2)<sup>(3)</sup>.

Las pruebas serológicas son un recurso diagnóstico eficaz en el reconocimiento rápido de la infección por VIH; están indicadas en poblaciones o circunstancias clínicas específicas en las que se recomienda su aplicación<sup>(1)</sup>:

- Personas con conducta de riesgo para la infección.
- Personas con trastornos clínicos asociados con la infección.
- Personas que recibieron sangre o productos sanguíneos entre 1978 y 1985.
- Personas con otras enfermedades sexuales.
- Mujeres en edad fértil.
- Hijos de madres con infección por VIH o con riesgo elevado.

**Tabla 3** Pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por VIH<sup>(3)</sup>

**1. Pruebas de screening**

- EIA
  - Indirecto
  - Competitivo
  - Tipo *sandwich*
  - De captura
- Otros:
  - Pruebas de aglutinación
  - Métodos de adherencia
  - Análisis por dot-blot

**2. Pruebas de confirmación**

- Western Blot
- IFI
- RIPA
- LIA y variantes

- Pacientes de 15 a 54 años en circunstancias sanitarias agudas con altas tasas de infección por VIH no sospechadas.
- Personas que sufren exposiciones ocupacionales que puedan ponerlas en riesgo de infección por VIH. Trabajadores de la salud que realizan procedimientos propensos a la infección.

**OBJETIVOS DE LAS PRUEBAS**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido de manera clara y sucinta cuáles son los objetivos de las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH:

- Seguridad biológica (cribado de donantes de sangre, órganos, semen, óvulos, etc.).
- Diagnóstico de la infección por el VIH.
- Vigilancia seroepidemiológica.
- Investigación.

Los estudios serológicos constituyen la metodología más frecuentemente utilizada para la investigación de anticuerpos vírales en suero o fluidos biológicos. Sirven para establecer el diagnóstico definitivo de la infección por VIH, por lo cual se utilizan para desechar o rechazar productos sanguíneos o biológicos contaminados; en este caso se denominan pruebas de cribado. Las pruebas serológicas se utilizan en la vigilancia seroepidemiológica de la infección por VIH y en la investigación clínica. En la tabla 3 se muestran

los diferentes tipos de pruebas para la detección de anticuerpos frente al VIH<sup>(3)</sup>.

El diseño de algunas pruebas permite realizar un gran número de análisis a la vez: son las llamadas pruebas de *screening*. La sensibilidad y la especificidad son los parámetros esenciales para valorar un test que vaya a ser empleado<sup>(2)</sup>. La prueba ideal es aquella en la que los valores de sensibilidad son del 100%; es decir, posee la máxima sensibilidad y nunca es negativa en caso de infección. Cuando el objetivo del cribado es obtener máxima seguridad en los productos biológicos (donaciones de sangre, semen, órganos, tejidos) el criterio preponderante es la máxima sensibilidad y deberá optarse por una técnica cuyo valor sensitivo se aproxime al 100%, y cuando el objetivo es el diagnóstico de la infección, el criterio de máxima especificidad es el prioritario<sup>(2)</sup>.

## PRUEBAS SEROLÓGICAS MÁS EMPLEADAS

### Enzimoinmunoanálisis

El enzimoinmunoanálisis (EIA) o ELISA es el método más utilizado como prueba de *screening*<sup>(3)</sup>. Los EIA utilizan enzimas como marcadores de antígenos o anticuerpos. Este tipo de inmunoensayo consta de 2 etapas. Una primera, inmunológica, en la que tiene lugar la reacción antígeno-anticuerpo, y una segunda etapa, en la que se determina fotométricamente la actividad de la enzima marcadora<sup>(4)</sup>. Existen diferentes tipos de EIA, dependiendo de la naturaleza del antígeno utilizado: los que provienen del lisado viral de un cultivo (EIA de 1ª generación) o bien corresponden a proteínas recombinantes o péptidos sintéticos (EIA de 2ª generación), que reproducen epítomos del virus. Los EIA de segunda generación son más sensibles y, sobre todo, más específicos que los de 1ª generación<sup>(5)</sup>. También las pruebas de EIA pueden estar diseñadas de manera indirecta o competitiva, de acuerdo al mecanismo por el cual reconozca la presencia de anticuerpos en la muestra problema. En general los EIA indirectos son más sensibles y los EIA competitivos más

**Tabla 4** Antígenos empleados en las pruebas de detección primaria de anticuerpos frente al VIH<sup>(10)</sup>

Técnica	Antígeno
EIA 1ª generación	Lisado viral VIH-1
EIA 2ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2
EIA/ELFA 3ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2 y antígeno VIH-1 del grupo O ( <i>outlayer</i> o marginal)
EIA/ELFA 4ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2 y VIH-1 «O», y anticuerpos para detectar el antígeno p24

específicos<sup>(5, 6)</sup>. En los últimos años se han desarrollado los EIA tipo *sandwich* (EIA de 3ª generación) y el EIA de captura, los cuales son más sensibles que los iniciales, y utilizan como antígenos proteínas recombinantes o péptidos sintéticos específicos para VIH-1, y en ocasiones otros específicos para el VIH-2<sup>(7)</sup>. Estas pruebas pueden detectar toda clase de anticuerpos y no solo la IgG; por este motivo su sensibilidad es mayor en el reconocimiento de la primoinfección por VIH-1, cuando la IgM es el primer marcador de la seroconversión, y en el diagnóstico de la infección pediátrica, que cursa con IgM e IgA solo si el niño está infectado<sup>(5)</sup>.

Con el fin de reducir el tiempo de diagnóstico en el periodo de ventana se han desarrollado los EIA de 4ª generación<sup>(5,8,9)</sup>, que permiten detectar simultáneamente antígeno-anticuerpo, con una media de 8 días antes que los EIA de 3ª generación. Las pruebas aprobadas por los bancos de sangre tienen una sensibilidad superior al 99%. Solo en muestras de individuos africanos existe un mayor número de falsos positivos y negativos, probablemente como consecuencia de la mayor heterogeneidad del virus en África y la existencia de hipergammagobulinemia relacionada con la parasitosis en muchos de esos pacientes<sup>(3)</sup>.

En la tabla 4 se muestran los antígenos empleados en las pruebas de EIA. La evolución de los antígenos incluidos en las pruebas de detección ha permitido,

478 por una parte, incrementar la sensibilidad sin merma de la especificidad y, por otra, ha hecho posible la detección de anticuerpos frente a tipos y subtipos del VIH que escapaban a los equipos de diagnóstico habituales. A pesar de las mejoras introducidas en los equipos actuales, debe tenerse en cuenta la posibilidad real de encontrar sueros de infectados por subtipos inusuales del VIH, sobre todo en pacientes africanos o en personas con estancias prolongadas en ese continente<sup>(10)</sup>. Las pruebas han sufrido también variaciones tecnológicas, siendo una de las más empleadas la utilización de sustratos fluorescentes que han dado lugar a las pruebas denominadas ELFA (*enzyme-linked fluorescent assay*)<sup>(10)</sup>.

Los resultados de EIA falsamente positivos pueden deberse a: administración de vacunas antigripales, administración de inmunoglobulinas fabricadas antes de 1985, mujeres con embarazos múltiples, alteraciones inmunes, hemodiálisis, hemofilia, prueba rápida de la reagina plasmática positiva, hepatitis B, hepatitis alcohólica<sup>(2,11)</sup>.

Los resultados de EIA falsamente negativos pueden deberse a: SIDA avanzado, infección precoz (antes de que se puedan detectar los anticuerpos) y algunos subtipos de VIH-1 (subtipo O)<sup>(2,11)</sup>.

#### **Pruebas de confirmación: Western Blot (WB).**

La trascendencia de la infección por el VIH hace necesaria la confirmación de los resultados positivos obtenidos en las pruebas de detección primaria de anticuerpos; este paso es inexcusable cuando el objetivo de las pruebas sea el diagnóstico y puede ser obviado cuando aquéllas se realicen para seguridad biológica<sup>(5)</sup>.

El *Western Blot* es la metodología más utilizada para confirmar los resultados que se han obtenido con las pruebas de *screening*. Esta prueba permite discriminar frente a qué antígenos virales se dirigen los anticuerpos presentes en la muestra problema<sup>(5)</sup>. En una reunión celebrada en abril de 1990 por los expertos de la OMS, se redactó una interpretación de la positividad de los resultados, según la cual se requiere la existencia de al menos dos bandas de envoltura; la negatividad es el resultado de la ausencia de banda

y los restantes patrones se consideran indeterminados<sup>(12)</sup>.

La OMS ha hecho las siguientes recomendaciones para tres situaciones:

1. En la primera existe la presencia aislada de la banda de la matriz nuclear p17. Esta reacción se considera negativa y no es necesario un seguimiento posterior.
2. La segunda situación se plantea cuando se presenta una banda de envoltura con o sin otra y es un patrón infrecuente, que puede observarse durante la conversión o infección por VIH-2 (es necesario repetir el *Western Blot* sobre la misma muestra).
3. Otros patrones (gag o pol sin env) pueden sugerir seroconversión, infección por VIH-2 o reactividad inespecífica.

El *Western Blot* tiene desventajas, entre las cuales están: su elevado costo, requiere un tiempo prolongado y personal experimentado. Tiene un diferente valor predictivo diagnóstico de cada banda, según el tipo de prueba, la procedencia de la muestra, las condiciones técnicas y el criterio del lector.

Un resultado indeterminado de *Western Blot* se puede deber a: seroconversión por VIH; infección por VIH-2; pacientes con estadio avanzado de la enfermedad cuando el deterioro inmunológico es grave y la presencia de inmunocomplejos puede reducir el título de anticuerpos anti VIH-1 circulantes; niños nacidos de madres seropositivas; individuos africanos infectados (divergencia genética de las cepas africanas del VIH-1); reactividad inespecífica o cruzada con otros anticuerpos (en enfermedades autoinmunes, mujeres múltiparas y, en menor proporción, donantes de sangre sanos)<sup>(5)</sup>.

Un resultado indeterminado con el WB constituye una fuente de mayor ansiedad para el paciente y desconcierto para el personal médico; en estos casos están indicadas otras pruebas, como RCP o cultivo, según el cuadro clínico y los factores de riesgo para la infección por VIH<sup>(3)</sup>. En la figura 1 se muestra el algoritmo diagnóstico de la infección por VIH en adultos<sup>(10)</sup>.

La existencia de anticuerpos frente a las proteínas de la envoltura hace que el WB sea una prueba alta-



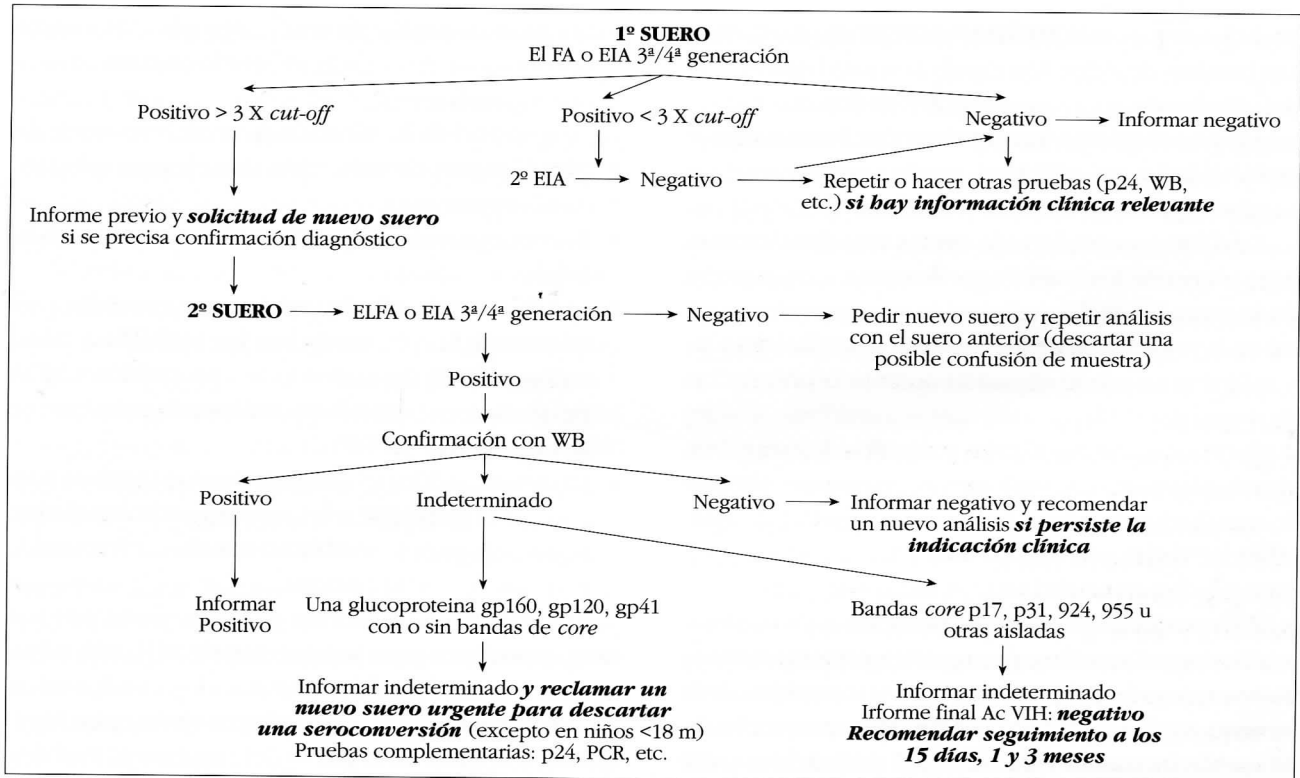


Figura 1. Algoritmo de decisiones para el diagnóstico serológico del VIH<sup>(10)</sup>.

mente específica, aunque también se han descrito casos de falsos positivos. Sin embargo, la sensibilidad del WB es mucho mayor para detectar anticuerpos frente a proteínas del core que de la envoltura<sup>(5)</sup>.

Los resultados falsos positivos ocurren en hiperbilirrubinemia, trastornos del tejido conectivo y gammapatías policlonales<sup>(1)</sup>.

Recientemente se han desarrollado algunas **pruebas accesorias**, que sirven en la discriminación y confirmación de las muestras reactivas en una prueba de *screening*. Una de estas es la LIA (inmunoanálisis lineal), que incorpora una o varias proteínas recombinantes o péptidos sintéticos del VIH-1 (y en ocasiones junto a antígenos del VIH-2), sobre un soporte plano<sup>(5)</sup>. Poseen gran sensibilidad y especificidad, lo que permite considerar su uso como pruebas confirmatorias. Éstas tienen una lectura más estructurada,

que se puede hacer por densitometría en algunos casos, obviando los problemas de subjetividad en la apreciación de la intensidad de las bandas<sup>(13)</sup>.

Las técnicas de IFI y RIPA, por razones distintas (subjetividad de la lectura, requerimientos de laboratorio, etc.), se emplean cada vez menos, de tal forma que los resultados del WB son considerados el estándar de confirmación de la presencia de los anticuerpos anti-VIH<sup>(10)</sup>.

## PRUEBAS DE DETECCIÓN RÁPIDA

Existen pruebas serológicas que permiten detectar antígenos VIH-1 con gran rapidez y sencillez. Se denominan pruebas de aglutinación y de inmunoadherencia (*dot-blot*)<sup>(3)</sup>. Estas pruebas han sido aprobadas para

480 situaciones urgentes, como la práctica de trasplantes. Las pruebas de detección rápida son más baratas y de más fácil realización que los EIA<sup>(5)</sup>, tienen una lectura visual y no requieren instrumentación. Poseen menor sensibilidad y especificidad, por lo cual su uso debe ser considerado de manera cuidadosa<sup>(2)</sup>.

Los CDC han establecido ciertas recomendaciones para el uso de los «*rapid-test*»: destacan su aplicación en la toma de decisiones para la terapia antirretroviral en la prevención de la transmisión vertical del VIH y así evitar su uso inadecuado durante la prevención perinatal del VIH.

Entre estas pruebas rápidas y sencillas destacan *Ora-quick* (Orasure, Technologies) que permite obtener los resultados de la prueba el mismo día<sup>(14,15)</sup>. La sensibilidad de las pruebas rápidas varía entre un 75% y 94% y la especificidad es excelente, con muy pocos falsos positivos<sup>(16)</sup>. Corrientemente los *rapid-test* son realizados sobre suero, pero existen prototipos sobre saliva, que evitan el pinchazo para la extracción de la sangre, por lo que la recolección de la muestra resulta menos incruenta y de más fácil realización; entre estos se encuentra el *Ora-Screen* (Orasure Technologies), el cual muestra una sensibilidad y especificidad, como test diagnóstico, de un 99,5% y 94,7% respectivamente<sup>(17)</sup>.

## DETECCIÓN DEL ANTÍGENO P24

Las pruebas de detección de anticuerpos anti-VIH son indicadores muy sensibles de la presencia de la infección, pero no aportan pruebas directas de la presencia del virus<sup>(5)</sup>. La detección del antígeno de la cápside p24 se realiza utilizando el método ELISA<sup>(1)</sup>. El antígeno p24 puede ser detectado en suero o plasma durante la fase aguda de la infección primaria por VIH y durante los estadios sintomáticos tardíos de la infección<sup>(18)</sup>. Las principales aplicaciones de la detección de la antigenemia p24 son:

- Monitorización de la respuesta a antivirales en individuos infectados por subtipos no B del VIH-1, por VIH-1 grupo O, por VIH-2.

- Diagnóstico precoz de la infección por VIH-1 (diagnóstico de certeza de la infección durante el período ventana inicial).
- Diagnóstico de la infección perinatal (vía vertical).
- Identificación de individuos con elevada infectividad (viremia alta).
- Reconocimiento de la infección viral en cultivos celulares.
- La antigenemia puede servir como marcador pronóstico de la enfermedad en los individuos infectados, pues su detección indica progresión a SIDA del portador asintomático, independientemente de sus niveles de CD4<sup>(19)</sup>.

La cuantificación del antígeno p24 fue utilizada para demostrar la respuesta a los agentes antirretrovirales, aunque actualmente se utilicen con mayor frecuencia ensayos de RCP en plasma<sup>(1)</sup>.

Los ensayos de detección de antigenemia p24 son muy específicos para la infección de VIH, son relativamente poco sensibles comparados con los ensayos de RCP para los ácidos nucleicos virales, y un resultado que se muestre negativo del antígeno p24 no descarta la infección por VIH<sup>(1)</sup>.

## AISLAMIENTO DE VIH EN CULTIVOS

El cultivo del VIH en medios celulares sigue siendo hoy en día una técnica de referencia, aunque su empleo quede restringido a laboratorios muy especializados. El aislamiento por cultivo del virus constituye la mejor evidencia de la infección vírica, y una herramienta imprescindible en la caracterización biológica de las diferentes cepas del VIH-1. A pesar de que las muestras más comunes para aislamiento son linfocitos de sangre periférica y líquido cefalorraquídeo (LCR), el VIH ha podido aislarse de gran número de fluidos orgánicos, entre los que se incluyen el plasma, suero, secreciones cervicales, semen, saliva, leche materna, lágrimas, orina, líquido alveolar, órganos de trasplante y tejido cerebral<sup>(10)</sup>.

El aislamiento es la técnica de referencia final para cualquier otra técnica y es obligado cuando se pre-

tende establecer el fenotipo de VIH (cepas inductoras de sincitio o no; IS/NIS), la actividad *in vitro* de antivíricos y puede servir de referencia de la cantidad de virus presente en la muestra del paciente. Sin embargo, el aislamiento de VIH presenta, como principal inconveniente, la necesidad de laboratorios con complejos sistemas de contención biológica<sup>(10)</sup>.

Su aplicación se produce en estudios de variabilidad genética, epidemiología molecular, sensibilidad a antirretrovirales, cinética de replicación, fenotipo, tropismo celular y uso de correceptores<sup>(2)</sup>. Su mayor aplicabilidad está en el marco del diagnóstico de infección pediátrica y particularmente ante la sospecha de infección silente<sup>(3)</sup>. El cocultivo de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un paciente infectado por VIH junto con PBMC de un donante sano es el método más eficaz para realizar el aislamiento del virus<sup>(5)</sup>.

La demostración de la presencia del virus se lleva a cabo por<sup>(3)</sup>:

1. Observación directa, con microscopio óptico.
2. Detección de proteínas específicas en el sobrenadante (p24).
3. Determinación de la actividad enzimática de la RT.
4. Detección del ADN proviral o del ARN proviral mediante RCP.
5. Reconocimiento de partículas víricas por microscopía electrónica.

Las metodologías serológicas tienen el inconveniente de depender de la capacidad de respuesta de los anticuerpos del huésped y de la variabilidad antigénica del virus. Por esto existen situaciones especiales, como es el caso de individuos con hipogammaglobulinemia (que padecen una disminución de anticuerpos por insuficiencia del paciente para responder de manera adecuada); los patrones serológicos atípicos de individuos africanos con SIDA, infecciones silentes y problemas de diagnóstico de la infección perinatal. Estos casos son candidatos a la detección del VIH por métodos alternativos, como es el aislamiento por cultivo, o detección de antígeno p24, o bien la detección de material genético del virus mediante amplificación por RCP<sup>(6)</sup>.

## RCP. DIAGNÓSTICO GENÉTICO

481

Para cuantificar la carga viral se emplean técnicas de biología molecular, o diagnóstico genético, que tienen su fundamento y origen en la llamada RCP o reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*), desarrollada a mediados de la pasada década; esta permite detectar fragmentos del genoma del VIH-1 u otros microorganismos. La base de este diagnóstico reside en la demostración de parte del genoma vírico a partir de muestras de sangre periférica. La RCP permite la amplificación exponencial de una secuencia de ácido nucleico del ARN proviral VIH, utilizando cebadores de oligonucleótidos, obteniéndose millones de copias. La amplificación proviral es particularmente importante, debido al bajo número de linfocitos infectados de un paciente<sup>(3)</sup>. La base de este diagnóstico reside en la demostración de parte del genoma vírico a partir de muestras de sangre periférica. Existen ciertos casos en los que esta técnica logra un diagnóstico más rápido y precoz de la infección VIH, en situaciones en las que el diagnóstico clásico serológico puede tardar en confirmarse, particularmente en recién nacidos de madres infectadas por VIH o con antecedentes de riesgo de infección VIH durante el embarazo y en sujetos con períodos ventana más largos del habitual. Otras situaciones en las que esta técnica o variantes de la misma pueden ser de utilidad son la demostración de infecciones por VIH-2 con serología no concluyente, infecciones dobles por VIH-1 y VIH-2 y más recientemente la detección de mutaciones específicas asociadas a la resistencia a los antivíricos<sup>(10)</sup>.

Las causas de los resultados falsos negativos incluyen errores en el rotulado, en la manipulación o el procesamiento de las muestras, variaciones de las secuencias en los sitios de fijación de los cebadores y una baja cantidad de copias de ARN proviral<sup>(20)</sup>.

Debido a su disponibilidad, la detección de ARN de VIH en plasma ha sido utilizada por algunos médicos para detectar infección por VIH aguda o en aquellos con ELISA reactivos y *Western Blot* indeterminados, aunque la prueba no está aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) para esta indicación<sup>(21)</sup>.



482 Se comercializan varios ensayos diferentes para detectar y cuantificar el ARN de VIH en el plasma; el test Amplicor (*Amplicor, Roche Molecular System*) tiene una sensibilidad para detectar infección por VIH mayor del 95% y la especificidad es superior al 95%<sup>(22)</sup>.

**Carga viral y RCP.** Desde 1996 se ha establecido la cuantificación de la carga viral como un indicador útil de progresión de la infección por el VIH. La carga viral mide la cantidad de virus VIH que la persona infectada tiene circulando en el plasma, a través de la cuantificación de copias de su material genético (ARN). Por lo general, la determinación se realiza en el plasma, aunque puede hacerse en otros líquidos y tejidos. Las técnicas de carga viral en plasma son más sensibles que el cultivo viral y la detección de antígeno p24. La carga viral es un marcador de la actividad del VIH-1, mientras que las cifras de CD4 miden la competencia del sistema inmune del individuo. Son útiles para determinar la etapa de la infección en la que se encuentra el paciente y constituyen un marcador de cuándo debe instaurarse profilaxis frente algunas infecciones<sup>(23)</sup>. Existen tres pruebas distintas para medir la carga viral: la reacción de polimerasa en cadena de la transcriptasa reversa (RCP), la prueba de ADN en cadena y la llamada NASBA, que se basa en la amplificación selectiva del ARN. Las tres tecnologías son fiables y reproducibles, pero difieren en su sensibilidad. Debido a que no hay un estándar uniforme entre estas meto-

dologías, debe usarse la misma prueba para monitorizar a un determinado paciente. Diversos trabajos han revelado que la RCP de Roche (*Amplicor*) y el ADN en cadena de Chiron (*Quantiplex*) dan resultados comparables. Algunos investigadores prefieren la prueba de ADN en cadena, debido a que es más simple de realizar. Sin embargo, la mayoría prefiere la RCP, debido a su mayor sensibilidad y capacidad de detectar niveles de ARN de VIH tan bajos como 400 copias/mL. Ambos laboratorios, Roche (RCP) y Chiron (ADN en cadena) vienen desarrollando pruebas de segunda generación aún más sensibles, que permiten medir niveles tan bajos como 20 copias/mL para la RCP y 300 copias/mL para el ADN en cadena. El riesgo de progresión a SIDA está directamente relacionado con el nivel de ARN del VIH-1. Cuanto más baja sea la carga viral, menor será el riesgo de progreso. En general, niveles de menos de 400 copias/mL están asociados con un pronóstico más favorable, mientras que los niveles mayores de 30.000 multiplican el riesgo de progresión clínica y probablemente hacen imprescindible la terapia antirretroviral, aun sin considerar el recuento de CD4. Por el contrario, individuos con menos de 500 linfocitos CD4/mm<sup>3</sup> y con carga viral muy baja, pueden postergar el inicio del tratamiento, si lo desean. Los parámetros para el inicio del tratamiento deben incluir siempre la determinación de la carga viral<sup>(24)</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mandell G, Bennett J, Dolin R. *Enfermedades Infecciosas, Principios y Práctica Médica*. 5ª ed. Madrid: Ed. Panamericana 2002:1670-6.
2. Cobo MF. *Aspectos clínicos y microbiológicos. Diagnóstico de la infección por HIV*. Jaén: Formación Alcalá 2001:339-50.
3. Gatell JM, Clotet B, Podzamczar D, Miró JM, Mallolas J. *Guía Práctica del SIDA*. 7ª ed. Barcelona: Masson 2002:111-22.
4. González de Buitrago JM. *Tecnología y métodos del laboratorio clínico*. 3ª ed. Madrid: Salvat 1992:332-33.
5. Soriano V, González-Lahoz J. *Manual del SIDA*. 4ª ed. Barcelona: Permanyer 2001:46-58.
6. Constantine N. Serologic test for retroviruses: approaching a decade of evolution. *AIDS* 1993;**7**:1-13.
7. Gurler L. Difficulties and strategies of HIV diagnosis. *Lancet* 1996;**348**:176-9.
8. Litvak E, Siegel JE, Pauker SG, Llallemant M, Finerberg HV, Weinstein MC. Whose blood safer? The effect of stage of epidemic on screening for HIV. *Med Decis Making* 1997;**17**:455-63.
9. Weber B, Mchbargane F, Berger A, Doerr H. Reduction of diagnosis window by new fourth-generation HIV screening assays. *J Clin Microbiol* 1998;**36**:2235-9.
10. Ortiz de Lejarazu, Eiros Bouza. *Pruebas de Diagnóstico Serológico de la Infección por VIH. Control de Calidad de la S.E.I.M.C. Revisión temática*. Departamento de Microbiología e Inmunología. Hospital Universitario de Valladolid. [www.seimc.org/control/revi\\_Sero/vihrev](http://www.seimc.org/control/revi_Sero/vihrev).

11. Wai ChT. False-positive HIV-1 Elisa in patients with Hepatitis B. (correspondence). *Am J Med* 2002;**112**:737.
12. CDC. Interpretation and use of the Western Blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. *MMWR. Morb Mortal WKLY Rep* 1998;**38**:1-7.
13. Soriano V, Gutiérrez M, Heredia A, Bravo R, Hewlett I, Gonzalez-Lahoz J. Evaluation of different supplementary assays for the confirmation of HIV-1 and HIV-2 infections. *Vox Sang* 1994;**66**:82-3.
14. Anonymous. Approval of a new rapid test for HIV antibody. *JAMA* 2002;**288**:2960.
15. S. AV, Karmarkar A, Bharucha K, Shrotri A, Pisal H, Suryawanshi N. Sensitivity and specificity of rapid HIV tests of pregnant women in India. *J Std AIDS* 2003;**14**:3741.
16. Anonymous. Orasure begins shipping rapid HIV test to hospitals. *Aids Alert* 2003;**18**:29-32.
17. Leow YH, Goh A, Lim PY, Chan RK, Goh CL, Kamarudin BA. Correlation between saliva and serum for human immunodeficiency virus 1 and 2 antibodies using a rapid test system. *Ann Acad Med Singapore* 1995;**24**:537-40.
18. Pugliese A, Savarino A, Cantamessa C, Bernengo MG. Detection of HIV p24 from antigen presenting monocytes for early diagnosis of HIV-1 infection. *Panminerva Med* 1997;**39**:159-64.
19. Machuca A, Gutierrez M, Mur A, Soriano V. Quantitative p24 antigenemia for monitoring response to antiretroviral therapy in HIV-1 group O -infected patients. *Antiviral Therapy* 1998;**3**:187-9.
20. Liu X, Zha J, Chen H, Nishitani J, Camargo P, Cole SW. Human immunodeficiency virus type 1 infections and replication in normal human keratinocytes. *J Virol* 2003;**77**:3470-6.
21. Daar E, Little S, Pitt J, Jacqui RN, Santangelo J, Joanne N. Diagnosis of primary HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 2001;**134**:125-9.
22. Barlow KL, Tosswill JH, Parry JV, Clawley JP. Performance of the Amplicor human immunodeficiency virus type 1 PCR and analysis of specimens with false-negative results. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:2846-53.
23. *Significado, procedimientos y recomendaciones para el uso de la cuantificación de la carga viral en la infección por VIH/SIDA* Revista SIDA-ETS. Febrero-Abril, 1997 Vol. 3, No.1 pp. 27-30. [www.ssa.gob.mx/conasida/revista/1997/num1/ets1-](http://www.ssa.gob.mx/conasida/revista/1997/num1/ets1-)
24. *Cuantificación de la Carga Viral*. Boletín nº 3 del laboratorio clínico ROE. 1999. [www.labroe.com/boletines/boletin3/vih.html](http://www.labroe.com/boletines/boletin3/vih.html).