

Técnicas inmunológicas moleculares como apoyo al diagnóstico microbiológico diferencial de infección aguda por VIH

Molecular immunological techniques to support the differential microbiological diagnosis of acute HIV infection

Andy Jefferson Solórzano Herrera

Solorzanoandy41@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-4149-3329>

Universidad Técnica de Machala, Ecuador

Artículo recibido 09 de diciembre de 2022 / Arbitrado 11 de enero de 2023 / Aceptado 02 marzo 2023 / Publicado 01 de abril de 2023

RESUMEN

Esta investigación buscó identificar métodos inmunológicos moleculares confirmatorios del VIH para el diagnóstico temprano de infecciones agudas, complementando el diagnóstico microbiológico diferencial. Se realizó un estudio descriptivo de un caso clínico utilizando análisis inmunológicos moleculares. Los resultados mostraron que los métodos inmunológicos moleculares abarcan desde técnicas de tercera generación, capaces de diagnosticar la infección en la fase aguda, hasta técnicas de cuarta generación que detectan la infección a partir de la tercera semana de contagio. Las pruebas confirmatorias, como el Western Blot y LIA, presentaron alta sensibilidad y especificidad. Las técnicas moleculares revisadas, como la detección de la p24 o la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), redujeron el tiempo de diagnóstico. En conclusión, los métodos inmunológicos moleculares permiten la detección temprana del VIH con alta precisión, brindando resultados de diagnóstico y confirmación a partir de la tercera semana de contagio.

Palabras clave: VIH; diagnóstico microbiológico diferencial; técnicas de Inmunoensayo en línea; técnicas moleculares; validez de prueba diagnóstica.

ABSTRACT

This research sought to identify HIV confirmatory molecular immunological methods for the early diagnosis of acute infections, complementing the differential microbiological diagnosis. A descriptive study of a clinical case was carried out using molecular immunological analyses. The results showed that molecular immunological methods range from third generation techniques, capable of diagnosing the infection in the acute phase, to fourth generation techniques that detect the infection from the third week of infection. Confirmatory tests, such as Western Blot and LIA, presented high sensitivity and specificity. Revised molecular techniques, such as p24 detection or Polymerase Chain Reaction (PCR), reduced diagnosis time. In conclusion, molecular immunological methods allow early detection of HIV with high precision, providing diagnostic and confirmation results from the third week of infection.

Keywords: HIV; differential microbiological diagnosis; online immunoassay techniques; molecular techniques; validity of diagnostic test.

INTRODUCCIÓN

Para el año del 2019 se reportó que aproximadamente 38 millones de personas entre niños y adultos fueron diagnosticados como pacientes seropositivos al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), desde 1990 al año 2019 la prevalencia del VIH a nivel mundial ha aumentado hasta casi 4 veces (ONUSIDA, 2019).

En el año de 1984 se reportaron los primeros casos de VIH en el Ecuador, la evolución de la epidemia de VIH desde esa fecha muestra una tendencia creciente hasta el año 2009 en el cual presenta un repunte de casos nuevos notificados de 5.336, esto es atribuido a los esfuerzos realizados en tamizajes para VIH a la población; a partir de ese año empieza una disminución de nuevos casos hasta el año 2013; en el año 2016 hay un nuevo repunte de casos debido ya que el tamizaje se incluye en actividades de promoción y prevención desde establecimientos de salud de primer nivel de atención

En la década más reciente, entre el 2010 - 2020, abarca al 68% de notificaciones de VIH, con un promedio en este periodo de 4.420 casos notificados.

Las estimaciones realizadas por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, con el apoyo técnico de ONUSIDA, indican que para el cierre del 2020 existirán 45.0561 personas viviendo con VIH -PVV en el país, y de estas, el grupo de edad entre 15 a 49 años es el más afectado por la epidemia, con mayor número de casos en hombres.

En el año 2020 se notificaron 3.823 casos nuevos de VIH, con un número menor de casos, comparado con el año 2019, donde se observó un menor esfuerzo de tamizaje de diagnóstico de VIH, dificultades en la adquisición de pruebas rápidas, la disminución al acceso de los servicios de salud por parte de la población y una menor ejecución de programas de prevención combinada de VIH para población clave, debido a la situación emergente por de la pandemia del Covid-19 (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2020).

Cuando una persona recibe un diagnóstico de infección por el VIH, a diferencia de lo que ocurre con algunos otros virus, el cuerpo no puede eliminar el VIH completamente. Una vez que la persona contrae el VIH, lo tendrá toda la vida. Actualmente no existe una vacuna o tratamiento que evite al VIH. Sin embargo, con un diagnóstico temprano y la inclusión inmediata a la atención médica con tratamiento antirretroviral garantizando una adherencia adecuada al mismo, se puede controlar la enfermedad y lograr una mejor calidad de vida.

Por esta razón el diagnóstico es importante para que el paciente comience con el tratamiento para controlar el VIH en su organismo y así evitar que se desarrolle la enfermedad.

El diagnóstico temprano de la infección se ha convertido en el objetivo alcanzar de medicina actual, en la presente investigación se analiza la importancia del diagnóstico microbiológico diferencial para la confirmación de infección por VIH, con la finalidad de diferenciar sus características para reforzar el diagnóstico.

La infección por VIH únicamente se puede establecer por métodos diferenciales de diagnóstico microbiológico debido a que ninguna de las manifestaciones clínicas es específica de VIH. Se analizaron las técnicas de laboratorio para diagnosticar la infección por VIH, revisando los métodos directos como técnica inmunoenzimáticas (ELISA), métodos directos como la detección del antígeno p24 y pruebas de confirmación como Western Blot y el inmunoensayo lineal (LIA), así como las pruebas de diagnóstico agudo p24 y PCR. (Aguilera et al., 2014).

Técnicas moleculares de diagnóstico diferencial

Antígeno p24

La proteína CA, core antigen o más conocida como (p24), es la proteína que conforma parte del cápside del virus del VIH, cada virus está formado por entre 1.500 y 3.000 moléculas de p24, siendo

esta la proteína viral más abundante durante la primera y tercera semana de contagio, este antígeno es utilizado para la determinación temprana de infecciones por VIH, aun antes de que los anticuerpos para VIH sean producidos (Díaz Torres et al., 2001).

Por tanto, se considera, un marcador precoz de la infección aguda por VIH y en la fase final (SIDA) determinado en suero o plasma. Esta proteína puede detectarse entre los días 11-13 después del contagio, permaneciendo en concentraciones sanguíneas elevadas durante 1-2 meses tras la infección. En la fase crónica su concentración disminuye por la presencia de los anticuerpos anti-VIH, pero, en la fase de SIDA sus niveles se elevan notablemente por la nueva replicación del virus (Díaz Torres et al., 2001).

Esta prueba permite también la detección del virus en recién nacido de madres VIH positivas. Se caracteriza por ser altamente específica (98-99%), pero su sensibilidad es relativamente baja (85%). Por lo general, esta prueba se usa en combinación con los ELISA de cuarta generación para confirmar el contagio (Álvarez-Carrasco, 2017).

PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la técnica molecular de elección al momento de diagnosticar una infección por VIH; su sensibilidad y especificidad es de 95 y 98% respectivamente (Cordeiro y Taroco, 2018). La introducción de esta técnica en la biología molecular ha contribuido notablemente en la implementación de numerosos ensayos y métodos útiles en el manejo del paciente seropositivo (García et al., 2011). Esta técnica detecta parte del genoma viral en una muestra sanguínea obtenida en EDTA, cuyo plasma ha sido separado antes de las 6 horas después de la toma de muestra. Finalmente, se procede a la cuantificación de la viremia plasmática o carga viral del paciente (Rodríguez Iglesias y Terrón Pernía, 2003). Se usa frecuentemente en casos de recién nacidos de madres seropositivas a donde su sensibilidad oscila entre 75-97%, detección de mutaciones genómicas del virus como consecuencia de la terapia antiviral, entre otros (Cordeiro y Taroco, 2018).

ELISA

Se encuentra en un punto medio entre las pruebas rápidas y las confirmatorias. Se caracterizan por su alta especificidad y sensibilidad. Para la detección de VIH se usan los de tercera y cuarta generación que comparten sensibilidad alta, cercana al 100%, y una especificidad del 99.5% (Álvarez-Carrasco, 2017). Para emitir un diagnóstico presuntivo de VIH, el paciente debe haber resultado reactivo en las pruebas rápidas y reactivo en el ELISA (efectuado por duplicado). El diagnóstico definitivo debe ser determinado por pruebas confirmatorias como LIA o WB. (Álvarez-Carrasco, 2017; Jaramillo Tobón, 2013).

WESTERN-BLOT (WB)

Es una técnica analítica de electroinmunotransferencia, cuyo propósito es detectar proteínas específicas en una muestra determinada usando electroforesis en gel para la separación de las proteínas contenidas en la muestra por tamaño (Springhorn y Hoppe, 2019). Una vez que las proteínas infectadas por VIH (antígenos virales) que han sido separadas y que están retenidas en el gel, se transfieren a un soporte sólido (tira de nitrocelulosa). Luego, esta tira se expone a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio, en este caso son los anticuerpos anti-VIH. Finalmente, se lavan y se visualiza la marcación de proteínas mediante el uso de anticuerpos primarios o secundarios afines con la proteína en estudio. La unión del antígeno-anticuerpo se detecta por fluorescencia o actividad enzimática. Se recomienda comparar la tira que contiene la muestra problema, con los controles positivos y negativos para evitar resultados erróneos (Gajón, 2002).

Los criterios de positividad son variados pero el que se adopta internacionalmente es el criterio de la OMS el cual indica que un resultado es positivo cuando presenta reactividad frente a dos de los antígenos virales p24, pg120 y pg41; un resultado negativo no debe mostrar ninguna reactividad y un resultado indeterminado presenta reactividad frente a una o más proteínas, pero no cumple con el

criterio de positividad; en este último caso, se recomienda repetir la prueba después de tres y seis meses. Actualmente se considera al Western-Blot una prueba altamente sensible (98-99%) y específica (99.9%) pero por su alto costo, se emplea como prueba confirmatoria principal cuando la prueba de Elisa ha resultado positiva para VIH. (Álvarez-Carrasco, 2017; Ortiz de Lejarazu y Eiros Bouza, 2014).

LIA

El empleo del Line Immuno Assay o LIA está menos difundido que las otras pruebas confirmatorias ya que se trata de un ensayo sumamente costoso que requiere tiempos prolongados para su determinación y equipos altamente sofisticados (Monsalve-Arteaga et al., 2017). En comparación con el WB, presenta menos reacciones cruzadas con los componentes de fabricación. Se trata de un inmunoensayo enzimático de especificidad y sensibilidad relativamente cercana al 100% capaz de detectar Ac específicos frente al virus del VIH como gp120, gp41, p24, p17 y p31 (Aguinaga et al., 2017).

Esta investigación tiene como objetivo Identificar los métodos inmunológicos confirmatorios de VIH mediante la diferenciación de sus características para determinar la infección aguda como refuerzo al diagnóstico microbiológico diferencial.

MÉTODO

Para el diagnóstico y confirmación de VIH, se utilizó el método cuali-cuantitativo. Cualitativo en razón a los inmunoensayos en línea para detectar infección por VIH, y cuantitativo porque se determinará la carga viral que presentan los pacientes infectados.

Pregunta a resolver

¿Qué análisis colaboran con el diagnóstico microbiológico diferencial en infecciones agudas ocasionadas por el VIH?

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de caso

Mujer de 22 años, sin antecedentes clínicos de interés ni alergias conocidas a medicamentos, que acude al Servicio de Urgencias con un cuadro de disuria intensa, polaquiuria y dolor lumbar de 24 horas de evolución. Presentaba fiebre de 39.5°C, hiperemia orofaríngea sin exudados y puño-percusión renal derecha positiva. El valor de la proteína C reactiva era de 41 mg/L y en el hemograma tenía un recuento leucocitario de 7,2 x 10³/mL con un porcentaje de neutrófilos del 90%. En el sistemático de orina se detectaban abundantes leucocitos y proteínas en ausencia de nitritos. En el sedimento se observaban 20-50 leucocitos/campo con presencia de levaduras. Se tomaron hemocultivos y un urocultivo. Se instauró tratamiento con amoxicilina-ácido clavulánico e ibuprofeno y fue dada de alta con el diagnóstico de infección urinaria no complicada.

Dos días más tarde la fiebre había remitido, pero vuelve a Urgencias por presentar lesiones exantemáticas en tronco, extremidades, palmas y plantas junto con lesiones vesiculares en boca y genitales, con afectación extensa. Los hemocultivos extraídos dos días antes de momento eran negativos, y en el cultivo de orina crecieron entre 104- 105 ufc/mL de *Candida albicans*. La bioquímica sérica básica era normal.

La paciente se deriva al Servicio de Dermatología para valoración. En la exploración se palpan múltiples adenopatías fibroelásticas, rodaderas, generalizadas y el dermatólogo informa que el cuadro simula un exantema multiforme con sospecha de síndrome mononucleósico. Solicita un nuevo hemograma y una bioquímica sanguínea, así como una serología de los virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV)

y de las hepatitis B y C. En esta analítica los parámetros bioquímicos continúan sin alteraciones, pero respecto a la anterior se observa un importante descenso de los leucocitos ($2,7 \times 10^3/\text{m/L}$) y también de los linfocitos, junto con una activación linfoide moderada y trombocitopenia ($103.000/\text{mm}^3$).

Todos los marcadores serológicos solicitados fueron negativos. Se pautan corticoesteroides y se cita a la paciente en dos semanas, solicitando para entonces nuevas analíticas. Transcurridos los 14 días, el cuadro dermatológico se había resuelto.

Los hemocultivos pedidos en la primera visita fueron negativos y los parámetros hematológicos y bioquímicos de ese momento se encontraban dentro de la normalidad. Respecto a los estudios serológicos, no se observó seroconversión respecto a los previos, pero uno de los estudios adicionales solicitados permitió realizar el diagnóstico etiológico. Asimismo, estudiadas en paralelo la primera muestra de suero y la segunda se pudo constatar que se trataba de una infección aguda.

La técnica de ELISA de cuarta generación permite la detección del Antígeno por péptidos obtenidos mediante síntesis o recombinación genética de VIH-1, VIH-2, VIH-1"O" + anticuerpos para detectar Ag p24 (detecta Ag/Ac) (Gajón, 2002; Ortiz de Lejarazu y Eiros Bouza, 2014). Por su parte, Álvarez y Carrasco (2017) en su estudio indican que ELISA de cuarta generación reduce el periodo de ventana a una semana, y además es la más utilizada para el diagnóstico de infección en pacientes mayores de 18 meses, no siendo muy útil en RN o lactantes <18 meses de madres seropositivas.

Ortiz de Lejarazu y Eiros Bouza (2014), en su estudio indican que el método de Western Blot es el método idóneo para la confirmación de la infección por VIH, debido a su alta sensibilidad (98-99%) y especificidad de (99.9%). Según Cordeiro y Taroco (2018) estas pruebas tienen un alto costo, y puede arrojar falsos negativos en caso de exposición reciente al virus.

La técnica de LIA tiene una especificidad y sensibilidad cercana al 100% y es capaz de detectar anticuerpos específicos frente al virus del VIH (gp120, gp41, p24, p17 y p31) (Monsalve-Arteaga et al., 2017; Aguinaga et al., 2017). En comparación con el Western Blot, las reacciones cruzadas generadas por componentes de fabricación son relativamente menores (Rodríguez Iglesias y Terrón Pernía, 2003).

El estudio realizado por Álvarez y Carrasco indica que la técnica Antígeno p24 detecta la proteína p24 a partir de 11vo – 13vo días después del contagio en la fase final de la enfermedad (SIDA), y posee una especificidad de (98-99%). (Álvarez-Carrasco, 2017). Mientras tanto García et al. (2011) proponen que el nivel de antígeno que detecta corresponde a un nivel de ARN viral de 30.000 a 50.000 copias/ml. Aunque no es el método ideal permite también la detección del virus en recién nacido de madres VIH positivas (Díaz Torres et al., 2001).

Según Cordeiro y Taroco (2018), la reacción en cadena de polimerasa es la Técnica molecular de elección al momento de diagnosticar una infección por VIH ya que su sensibilidad y especificidad son del 95 y 98% respectivamente, siendo usada frecuentemente en recién nacidos de madres seropositivas al VIH y en la detección de mutaciones genómicas del virus.

CONCLUSIONES

Los métodos inmunológicos moleculares para el diagnóstico diferencial de VIH comprenden, desde técnicas de tercera generación, capaz de diagnosticar infección una vez alcanzada la fase aguda, hasta técnicas de cuarta generación capaz de detectar la infección a la tercera semana del contagio, dentro de las pruebas de confirmación se revisaron técnicas altamente sensibles; Western Blot es una técnica con sensibilidad de 98 a 99% y especificidad de 99,9 %, al igual que los Inmunoensayos Lineales con especificidad y sensibilidad cercana al 100%.

Las técnicas moleculares revisadas pueden reducir el tiempo de diagnóstico a partir del décimo

primer día como la p24 o la Reacción en cadena de polimerasa (PCR) que son métodos de diagnóstico y confirmación ideal en neonatos y gestantes menores de 18 meses.

Dentro de las técnicas inmunoenzimáticas el método ELISA de cuarta generación es el ideal para diagnosticar infección por VIH debido a que reduce el periodo de ventana a una semana, mediante la detección de péptidos de VIH-1, VIH-2, VIH-1 "O" más anticuerpos para detectar p24.

Los Inmunoensayos en Línea presentan mayor especificidad y sensibilidad en relación al método de Western Blot, que pueden ocasionar reacciones cruzadas por errores de fabricación en menor porcentaje, siendo capaz de detectar anticuerpos específicos frente al virus del VIH como gp120, gp41, p24, p17 y p31. La Reacción en Cadena de Polimerasa presenta mejor sensibilidad y especificidad en relación al diagnóstico confirmatorio de VIH, una de sus ventajas es que permite la detección de infección vertical de VIH en los recién nacidos, con una mayor sensibilidad que la p24, reduciéndose el tiempo de detección a 13-15 días después de la infección. Con estas técnicas de cuarta generación la sensibilidad aumenta y se reduce la posibilidad de un falso negativo, aunque hay que tener en cuenta que esta circunstancia se puede dar, sobre todo, en la primera fase de la infección hasta que se produce la seroconversión (periodo ventana), y en menor medida, en estadios finales de la infección, en pacientes con tratamiento inmunosupresor, trasplantados de médula ósea y en personas con alteraciones de linfocitos B.

REFERENCIAS

- Aguilera, A.; Álvarez Estévez, M.; Reina González, G.; Rodríguez, C. (2014). Diagnóstico Microbiológico de la Infección por el VIH.
- Aguinaga, A.; Navascués, A.; Polo, I.; Ezpeleta, C. (2017). Comparative Study of HIV-1/2 Antibody Confirmatory Assay: Geenius™ versus INNO-LIATM. *Rev. Esp. Quimioter.*, 30 (1), 40–44.
- Álvarez-Carrasco, R. I. (2017). Interpretación de Las Pruebas Usadas Para Diagnosticar La Infección Por Virus de La Inmunodeficiencia Humana. *ACTA MEDICA Perú*. 2018. <https://doi.org/10.35663/amp.344.464>.
- Cordeiro, N. y Taroco, R. (2018). Retrovirus y VIH. *Temas de bacteriología y virología médica*.
- Díaz Torres, H. M.; Ribas Antúnez, M. de los Á.; Lubián Caballero, A. L.; Joanes Fiol, J.; Ricardo Fonseca, M. E. (2001). Antigenemia P24: Correlación Con Algunos Aspectos Clínicos y Epidemiológicos En 100 Individuos Cubanos Infectados Por VIH-1. *Rev. Cuba. med. Trop.* 53(3): 137–144.
- Gajón, M. (2002). Métodos de Detección del Virus de Inmunodeficiencia Humana. 2(2): 2.
- García, F.; Álvarez, M.; Bernal, C.; Chueca, N.; Guillot, V. (2011). Diagnóstico de Laboratorio de La Infección Por El VIH, Del Tropicismo Viral y de Las Resistencias a Los Antirretrovirales. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.12.006>.
- Jaramillo Tobón, A. (2013). Serología de Cuarta Generación, Biología Molecular Diagnóstica y El Nuevo Algoritmo Para Diagnóstico de Infección Por VIH. *Serol. cuarta generación, Biol. Mol. diagnóstica y el nuevo Algoritm. para diagnóstico Infección por VIH*.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2020). Subsecretaría Nacional de Vigilancia de la Salud Pública. *Boletín Anual de VIH/Sida. Ecuador: Estrategia Nacional de VIH/sida-ITS*.
- Monsalve-Arteaga, L.; Drummond, T.; Faneite, I.; Carballo, M.; Landaeta, M. E. (2017). Morbilidad, Mortalidad y Falla Al Tratamiento Antirretroviral En Adolescentes Con VIH / Sida En Un Hospital de Referencia En Caracas, Venezuela. *Infectio*; 21(3): 160–167. <https://doi.org/10.22354/in.v21i3.673>.
- ONU-SIDA (2019). Boletín informativo. Ecuador. <https://www.unaids.org/es/keywords/ecuador>
- Ortiz de Lejarazu Leonardo, R.; Eiros Bouza, J. M. (2014). Pruebas de Diagnóstico Serológico de La Infección

Por El VIH. Control Calid. SEIMC.

Rodríguez Iglesias, M.; Terrón Pernía, A. (2003). Diagnóstico de la Infección por el VIH. La Infección por el VIH guía práctica.

Springhorn, A.; Hoppe, T. (2019). Western Blot Analysis of the Autophagosomal Membrane Protein LGG-1/LC3 in *Caenorhabditis Elegans*, Elsevier Inc., 619. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.12.034>.