

Diagnóstico microbiológico de la infección por HIV

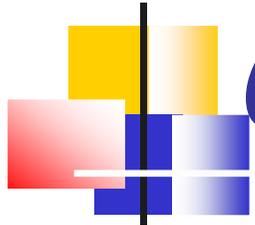
Juan Carlos Rodríguez Díaz

S. Microbiología

Hospital General Universitario de Alicante

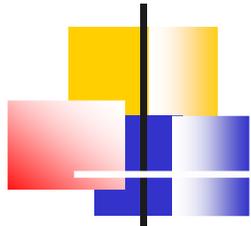
E-mail: rodriguez_juadia@gva.es

<http://microbiología-alicante.umh.es>

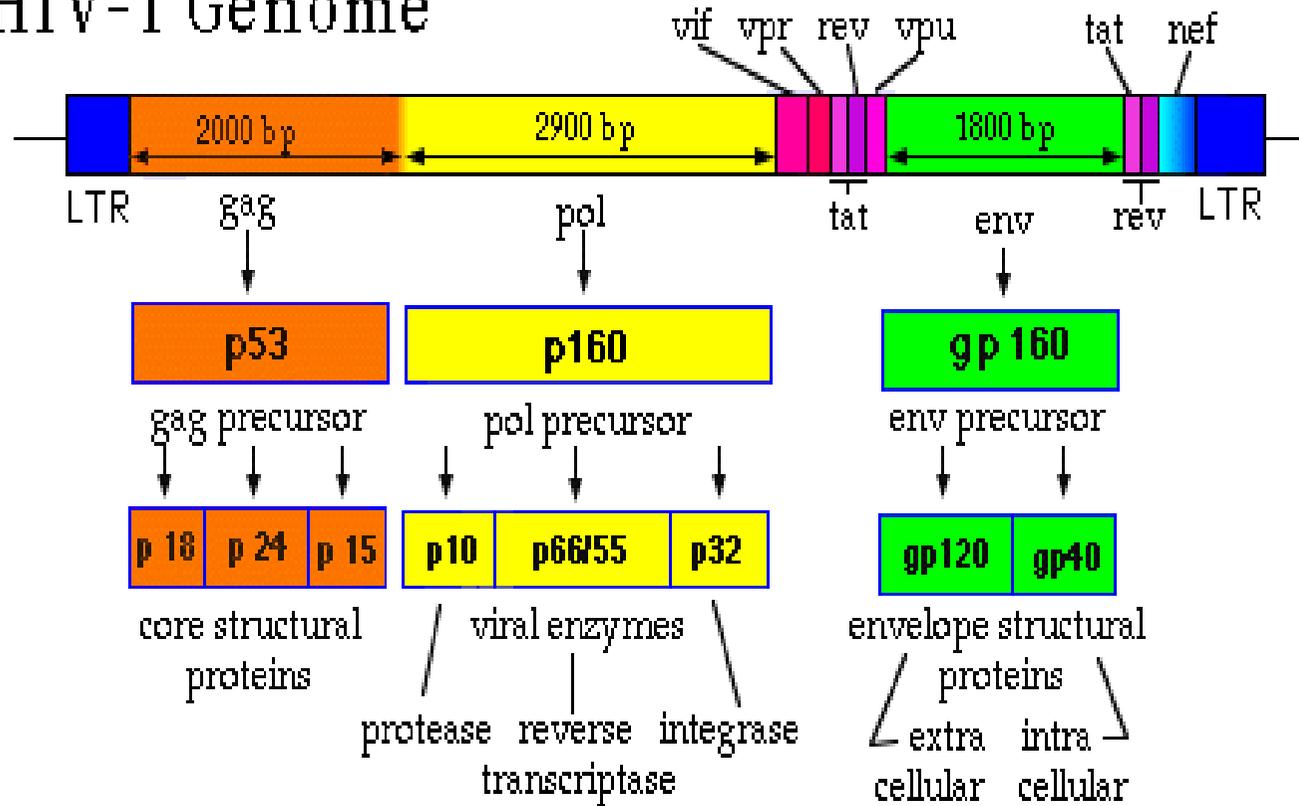


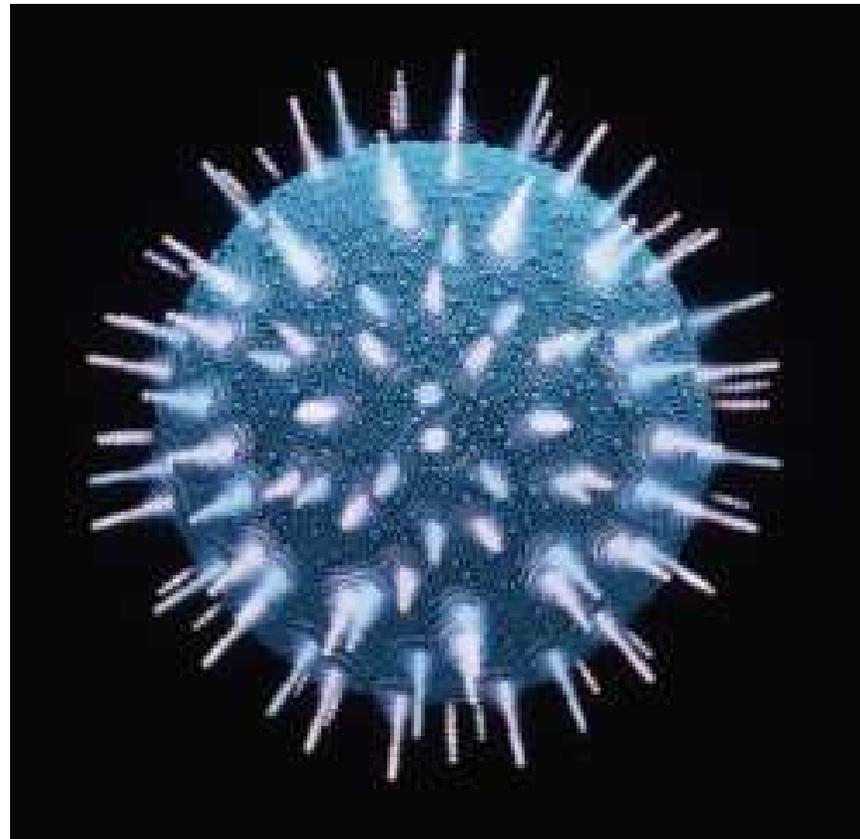
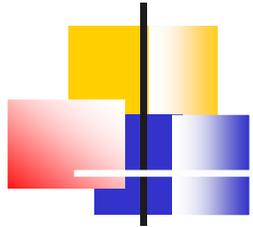
Generalidades

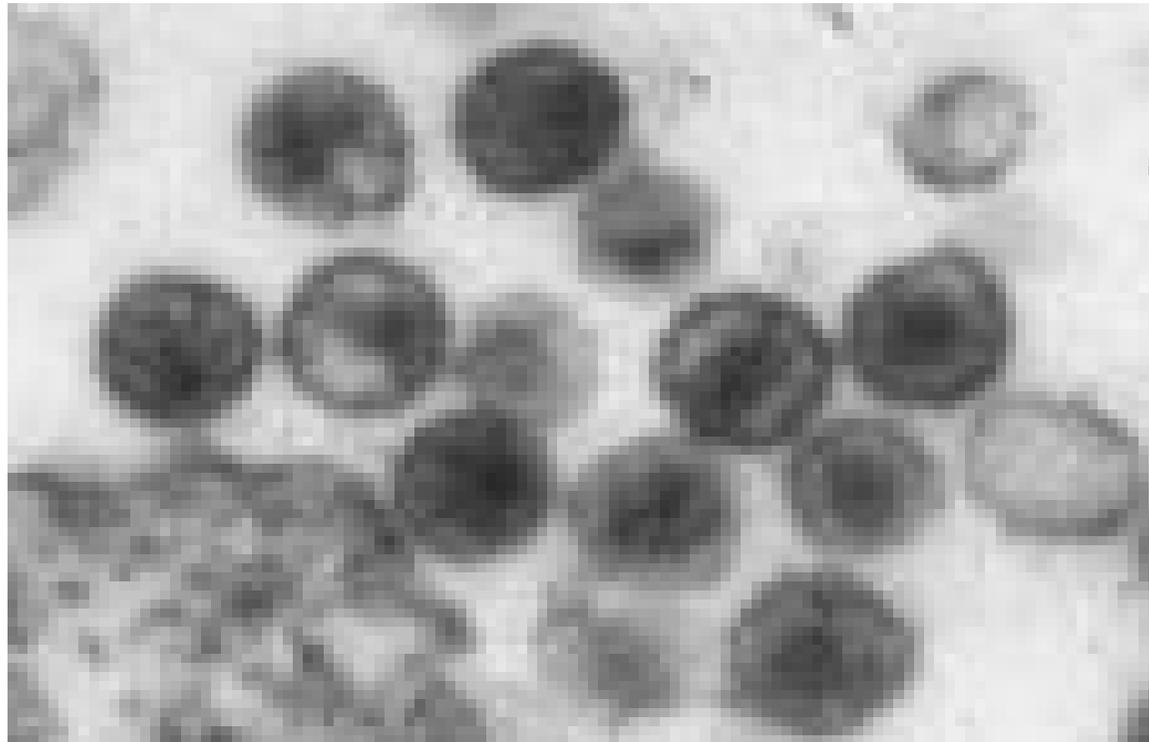
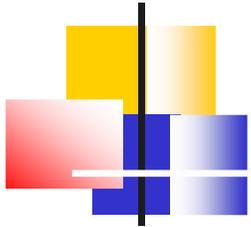
- Virus implicados en la patología en humanos: HIV-1y HIV-2
- Retrovirus del género Lentivirus: Largo periodo de incubación hasta la enfermedad
- Virus RNA que utiliza la transcriptasa inversa para reproducirse
- El genoma viral codifica proteínas estructurales y reguladoras
 - Env: Envoltura vírica (gp160, gp120, gp41)
 - Gag: Proteínas del core (p17, p24)
 - Pol (Enzimas de replicación) y reguladoras

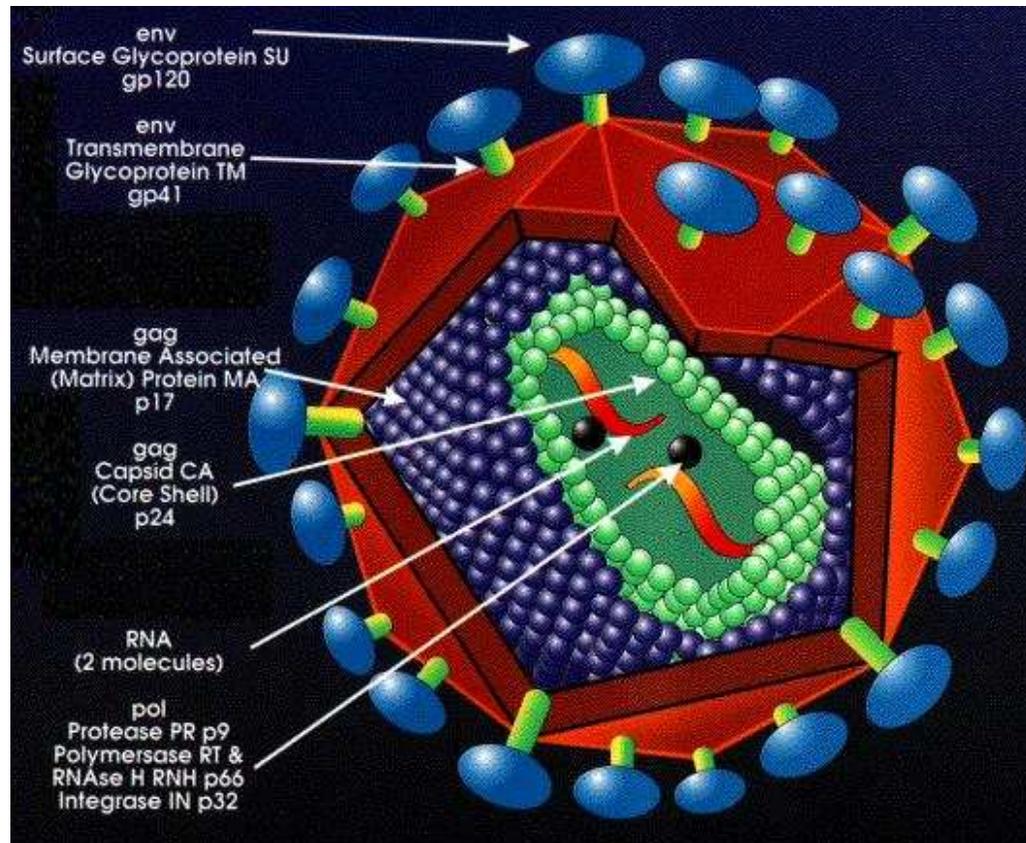
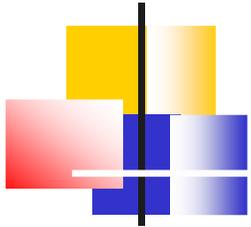


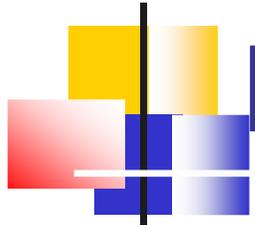
HIV-1 Genome





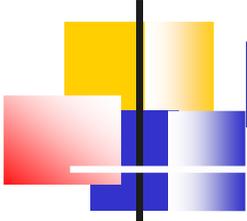




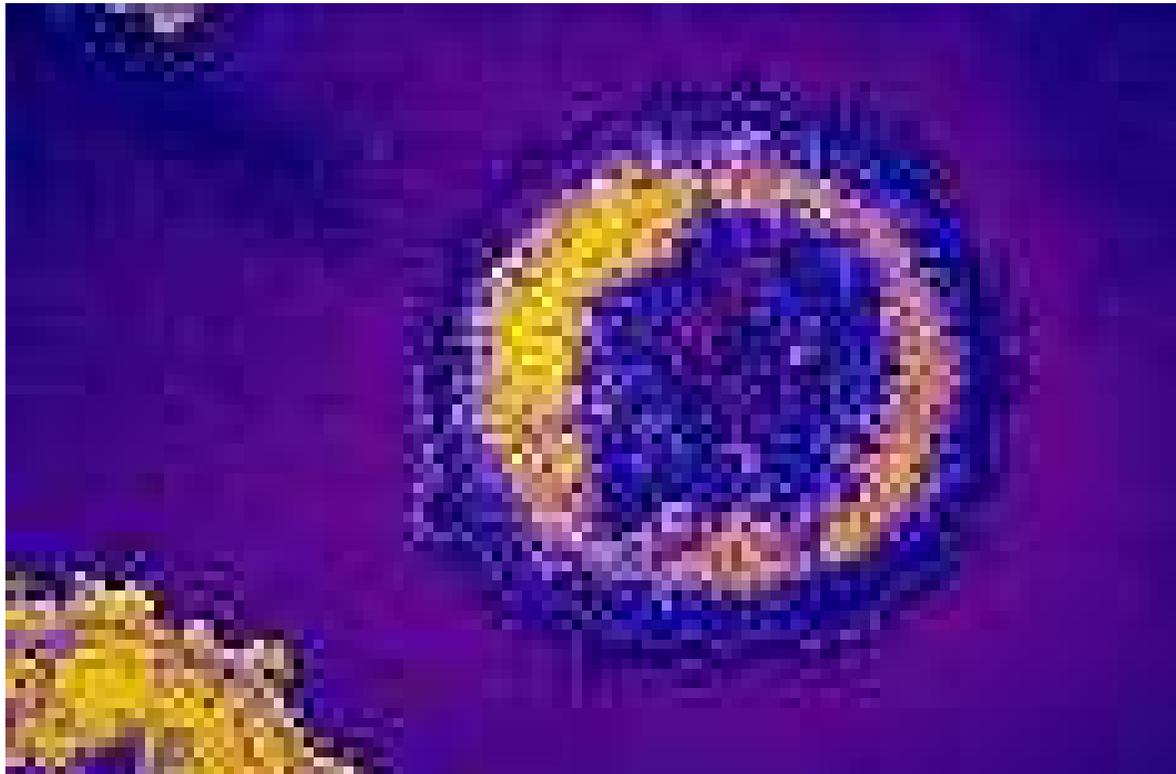


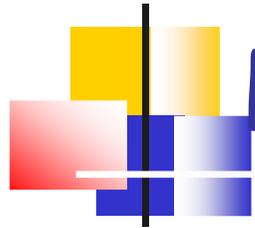
Patogénesis

- Primero se produce la unión del virus a receptores específicos de la célula (R5 ó X4) a través de la proteína gp120.
- Los receptores están en linfocitos CD4, macrófagos, cerebrales de glia, de Langerhans de la piel y de la pared intestinal)
- Entra el ARN viral y la transcriptasa inversa
- Se forma DNA viral
- Se integra en el DNA celular (latencia)
- En la reactivación, se produce RNA mensajero que sintetiza antígenos víricos



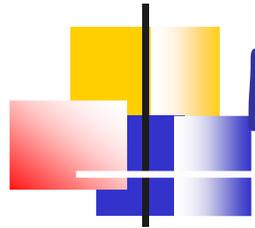
Patogénesis



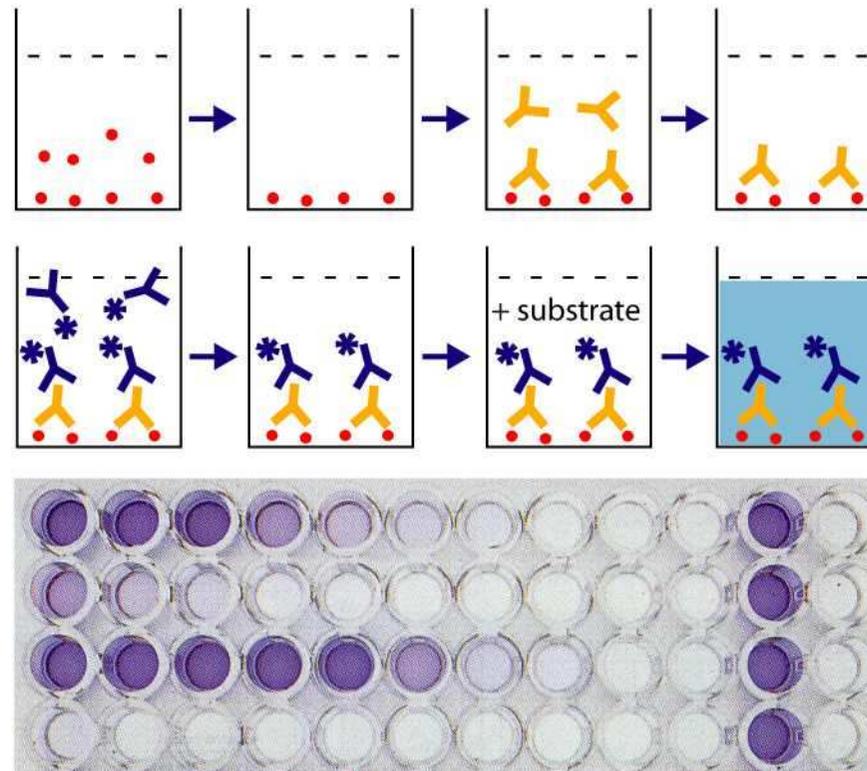


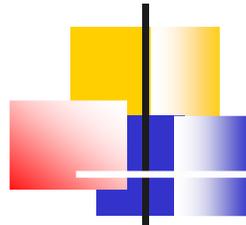
Pruebas diagnósticas de cribado

- Emplean conjuntamente Ac frente al HIV-1, HIV-2 y subgrupo O. También detectan Ag p24 conjuntamente o de forma separada
- Generalmente mediante detección de anticuerpos en suero mediante ELISA
- Pruebas de EIA (enzimo-inmunoensayo) de membrana: Pruebas rápidas



Pruebas diagnósticas de cribado

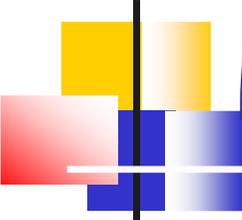




Falsos negativos

Tabla 8. Causas de falsos negativos en pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH

- Periodo *ventana* que precede a la aparición de anticuerpos
- Infección por tipos de VIH no detectables por los antígenos incluidos en la prueba
- Terapia inmunosupresora prolongada
- Trasplante de médula ósea
- Disfunciones de linfocitos B
- Plasmaféresis, exanguinotrasfusión
- Neoplasias
- Errores de extracción o identificación
- Fallos en el principio técnico o proceso de fabricación del equipo diagnóstico
- Respuestas anómalas ante la infección por el VIH



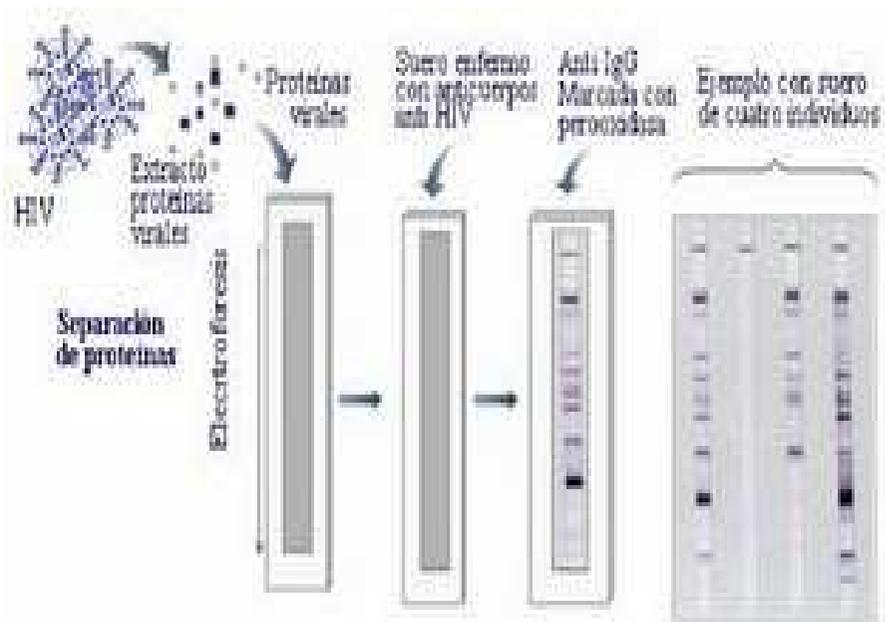
Pruebas confirmatorias

- Todos los sueros positivos deben ser confirmadas por Western Blot
- Las proteínas del virus se separan en una tira de nitrocelulosa (incluye proteínas del HIV_1 y HIV-2).

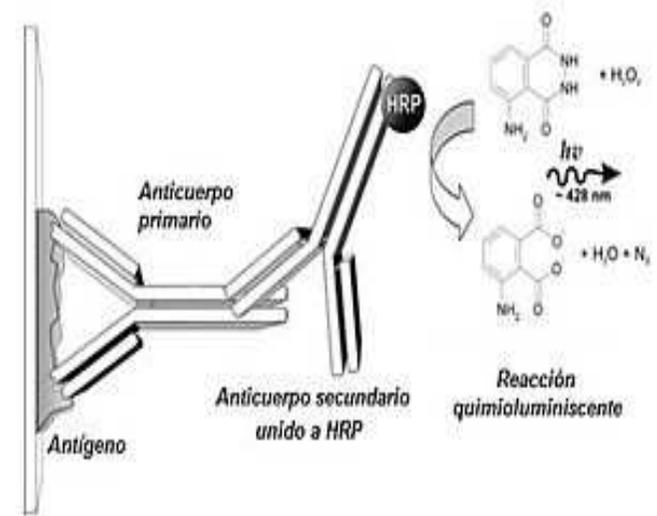
Se considera un suero positivo si hay anticuerpos frente a dos de las tres proteínas más importantes del virus (gp160, gp120, gp41)

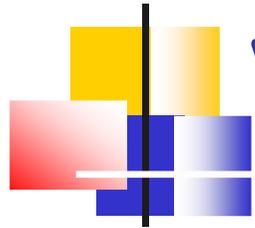
- Si no cumplen los criterios, se llama WB indeterminado

Western Blot



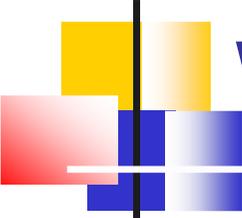
Técnica de inmunoglottin. Consiste en la separación electroforética de proteínas virales, y posterior revelado con anti-IgG marcada con peroxidasa





Western Blot indeterminado

- Falsos positivos del ELISA en muchas situaciones:
 - Hemodializados
 - Embarazo
- Infección por HIV-2
- Primoinfección
- Se debe hacer:
 - Seguimiento serológico
 - PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)
 - PCR para HIV-2 si hay reactividad en las bandas de este virus

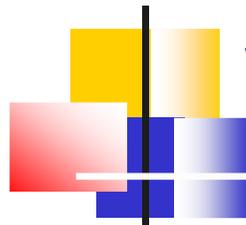


Western Blot

Tabla 3. Criterios de positividad en WB para confirmación de infección por el VIH-1.

CRITERIO	REACTIVIDAD FRENTE A
Organización Mundial de la Salud	Dos glicoproteínas cualquiera de: gp160, gp120, gp41
Cruz Roja Americana	Una proteína de cada gen estructural (<i>env</i> , <i>pol</i> y <i>gag</i>)
Food and Drug Administration	p24 + p32 + (gp41 o gp120 o gp160)
CRSS*	p24 + (gp41 o gp120 o gp160) o p32 + (gp41 o gp120 o gp160)
CDC/ASTPHLD**	p24 + (gp41 o gp120 o gp160) o gp41 + (gp120 o gp160)

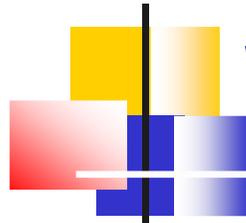
*Consortium for Retrovirus Serology and Standardization. **Centers for Disease Control/Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors



WB indeterminado

Tabla 5. Reactividades frecuentes en resultados indeterminados de Western Blot

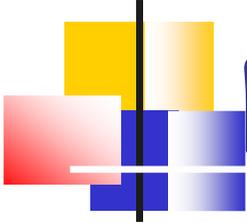
Bandas de reactividad observadas	Posible causa y seguimiento
Una glicoproteína aislada (gp160, gp120 o gp41)	<p>Inicio de la seroconversión, infección por otros tipos de VIH, frecuente en la serorreversión pediátrica (hijos de madres infectadas)</p> <p>Repetir WB en otro suero 7 días más tarde en adultos. En niños PCR y seguimiento.</p>
P24 aislada	<p>Descartar VIH-2 u otros tipos VIH según procedencia geográfica</p> <p>Frecuente en resultados indeterminados de embarazadas, multitransfundidos y pacientes africanos.</p>
P17 aislada	<p>Descartar VIH-2 u otros tipos de VIH. Otros retrovirus (HTLV-I/II)</p> <p>Puede persistir años en pacientes VIH-seronegativos</p> <p>Causa desconocida</p> <p>No es necesario el seguimiento</p>
Otras bandas del <i>core</i> aisladas	<p>Inespecificidades muy variadas (ver tabla 8)</p> <p>Anamnesis para posibles factores de riesgo o de WB indeterminado</p> <p>Seguimiento a los 7-15 días si hay factores de riesgo</p>
Más de una banda del <i>core</i> o bandas no víricas	<p>Frecuente en multitransfundidos, enfermedades autoinmunes, etc.</p> <p>Anamnesis para posibles factores de riesgo.</p> <p>Seguimiento hasta 3-6 meses para ver evolución.</p>



WB indeterminado

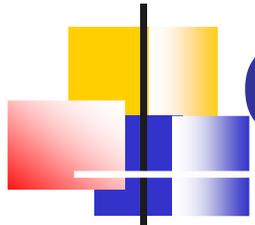
Tabla 7. Causas de falsos positivos en pruebas séricas de detección de anticuerpos frente al VIH

Relativas al suero	Relativas a autoanticuerpos	Relativas a otras condiciones
<ul style="list-style-type: none"> • Congelación y descongelación repetida • Almacenamiento a temperatura subóptima • Aspecto lipídico o turbio del suero • Contaminación microbiana • Sueros tratados con calor (≥ 60 °C) • Errores de extracción o identificación 	<ul style="list-style-type: none"> • Personas con anticuerpos anti-HLA-DR4, DQw3 • Enfermedades reumatoideas Polimiositis • Lupus eritematoso • Multitrasfundidos • Trasplantados renales • Multiparas 	<ul style="list-style-type: none"> • Hemodializados, fracaso renal crónico • Síndrome de Stevens-Johnson • Administración previa de inmunoglobulinas • Sueros postvacunales (gripe, hepatitis B) • Infecciones agudas por virus ADN • Enfermedad hepática alcohólica grave • Cirrosis primaria biliar, colangitis esclerosante • Pacientes con parasitosis (sanguíneas o tisulares) • Pacientes con discrasias sanguíneas congénitas • Usuarios de drogas por vía parenteral



Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

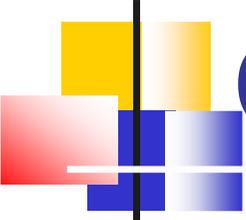
- Detecta la presencia del genoma viral en el plasma del enfermo
- Se realiza por PCR a tiempo real, por lo que es cuantitativa (carga viral)
- Útil para diagnosticar
 - Primoinfección
 - Solucionar la interpretación de WB indeterminados
 - Técnica confirmatoria
 - Diagnóstico del neonato
 - Diferenciar infección por HIV-1 y HIV-2



Casas comerciales

Tabla 9. Técnicas disponibles para la detección de la carga vírica plasmática

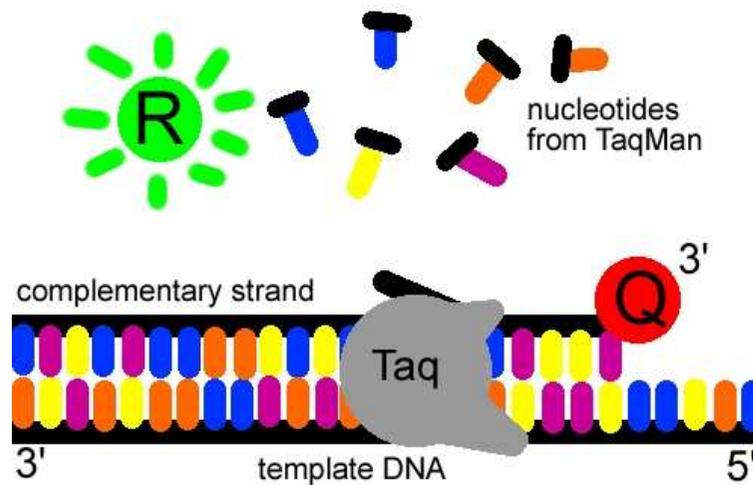
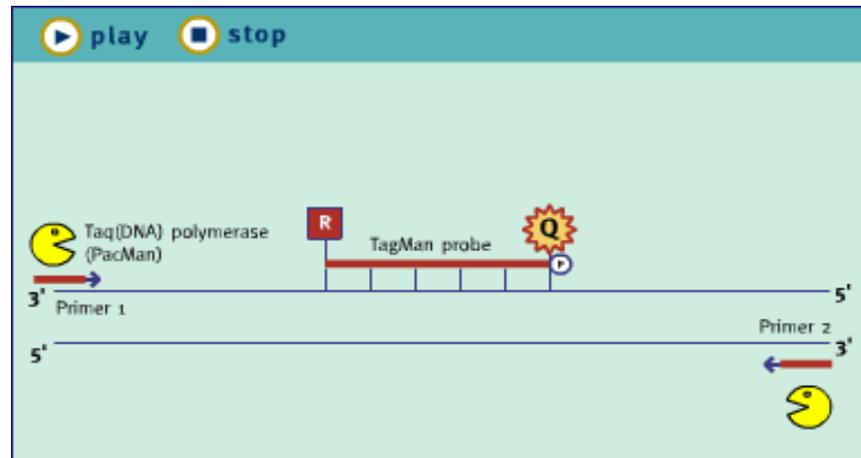
Nombre (Compañía)	Técnica		Comentarios
Monitor (Roche)	RT-PCR		Extracción automática disponible Subtipos A-G
Taqman (Roche)	RT-PCR real	tiempo	Extracción automática disponible Subtipos A-G
Abbott Real Time (Abbott)	RT-PCR real	tiempo	Extracción automática disponible Subtipos A-K y grupo O
Versant (Bayer)	bADN		Subtipos A-G
NucliSens (BioMerieux)	NASBA		Extracción automática disponible Subtipos A-G

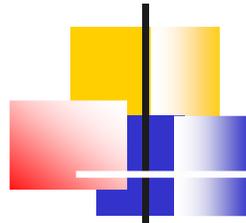


Casas comerciales

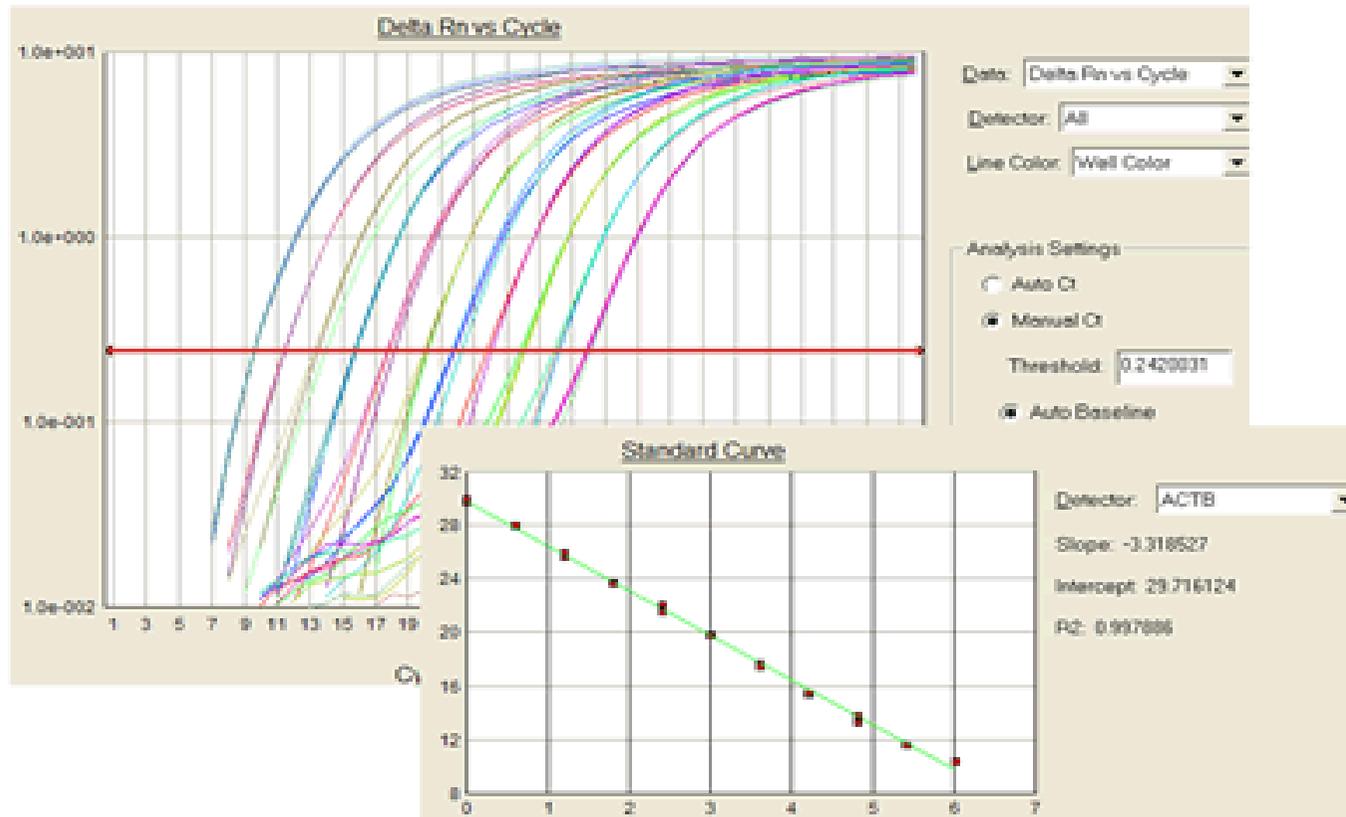


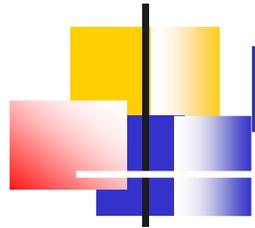
PCR a tiempo real





PCR a tiempo real

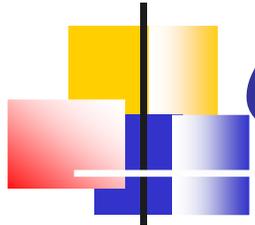




Estabilidad de la muestra

Tabla 10.- Estabilidad del VIH-1 para la determinación de la carga vírica plasmática

Sangre completa	6 horas
Plasma separado temperatura ambiente	24 horas
Plasma separado 4° C	6 días
Plasma separado -20°C	Variable (no recomendado para almacenamiento a largo plazo)
Plasma separado -80°C	Meses

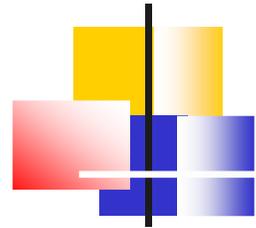


Cultivo viral

- Método muy complejo que no se utiliza en el diagnóstico de forma habitual
- Muestras del paciente: sangre, suero, plasma, LCR, tejidos, leche materna, etc.
- Se realiza en un cultivo de linfocitos humanos activados con fitohemaglutinina y interleuquina -2. Se incuban 4 semanas
- Se detecta la presencia del virus midiendo la actividad retrotranscriptasa en los sobrenadantes o midiendo la presencia del antígeno p24

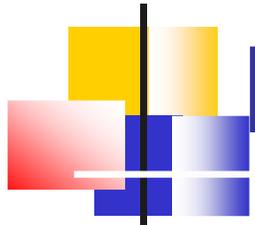
Cultivo viral



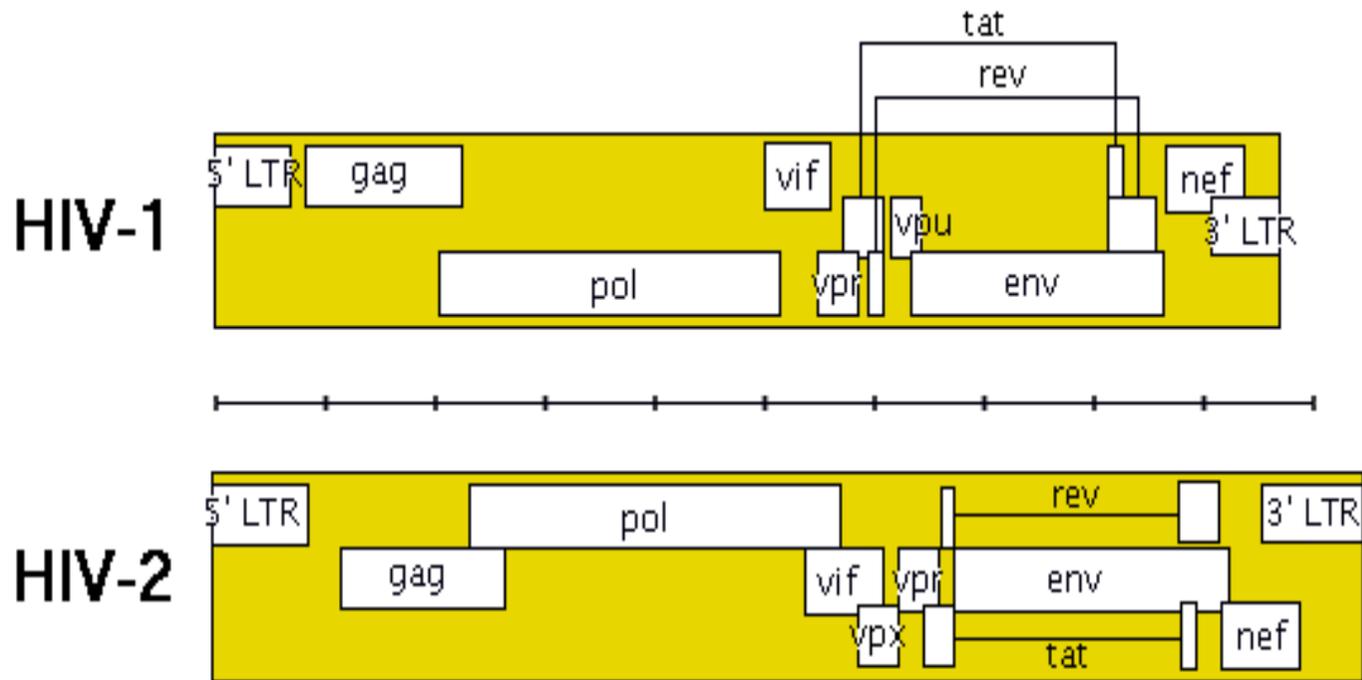


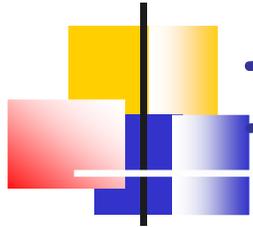
Diferenciación HIV-1/HIV-2

- En España, la mayoría de las infecciones se asocian al HIV-1
- Mediante las técnicas de cribado no se puede diferenciar.
- Se asocia epidemiológicamente con Africa
- Mediante WB se puede demostrar la presencia de las proteínas gp140, gp105 y gp36.
- El WB para el HIV-1 da resultados indeterminados.
- Puede haber infecciones mixtas por ambos virus
- Mediante PCR se pueden diferenciar



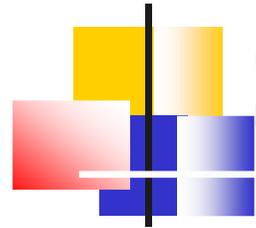
HIV 1/HIV 2





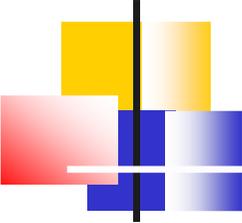
Interpretación de los resultados

- La presencia confirmada de anticuerpos indica que el paciente es portador del virus y por tanto puede contagiar la enfermedad
- Un resultado negativo de una técnica de cribado descarta la infección excepto en primoinfección
- Todos los resultados positivos de una técnica de cribado, deben ser confirmados por Western Blot y por PCR



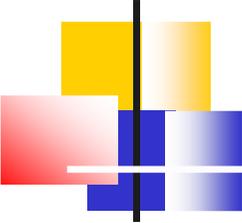
Diagnóstico de primoinfección

- Suele ser asintomática o producir un cuadro mononucleósido
- Los anticuerpos suelen aparecer entre los 2 y los 4 meses y se mantienen positivos durante toda la vida del enfermo
- En ese periodo ventana se puede detectar la presencia del virus mediante Ag p24 y PCR
- En este periodo el WB puede dar resultados indeterminados (el sistema inmune genera los anticuerpos de forma secuencial)



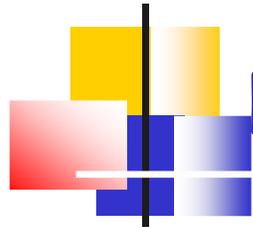
Diagnóstico en el embarazo

- La transmisión vertical es la principal forma de transmisión del HIV a los niños, pero no se infectan todos los niños. El riesgo es mucho mayor si la madre no está tratada
- Actualmente se estudia la serología a todas las embarazadas
- Se debe controlar el HIV por:
 - Posibilidad de interrumpir el embarazo
 - Tratar correctamente a la madre
 - Aplicar medidas obstétricas especiales
 - Dar profilaxis al recién nacido



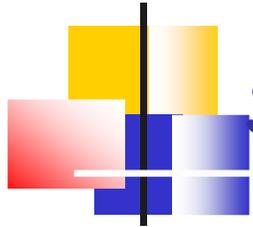
Diagnóstico en neonatos

- Características especiales:
 - La IgG de la madre atraviesa la placenta y se detecta aunque el niño no esté infectado
 - Los anticuerpos de la madre se mantienen hasta 15 meses
 - En infección perinatal puede retrasarse la seroconversión
 - Se diagnostica por seguimiento serológico y por PCR para
 - ELISA: Demostrar la desaparición de Ac de la madre
 - WB: Aparición de nuevas bandas
 - PCR: Presencia de RNA viral



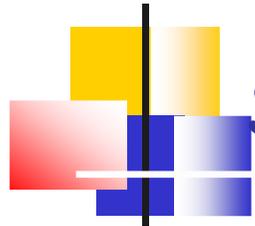
Diagnóstico de accidentes de trabajo

- El riesgo de transmisión por contacto pericutáneo con sangre infectada es bajo: 0.1-0.7%. Puede hacerse profilaxis en las primeras 24-48 horas postexposición.
- Debe realizarse serología de la fuente y del paciente en el momento del contacto. Si el paciente es positivo indica infección previa.
- Control serológico del accidentado a los 3, 6 y 12 meses
- Puede hacerse estudio por PCR antes de los 3 primeros meses

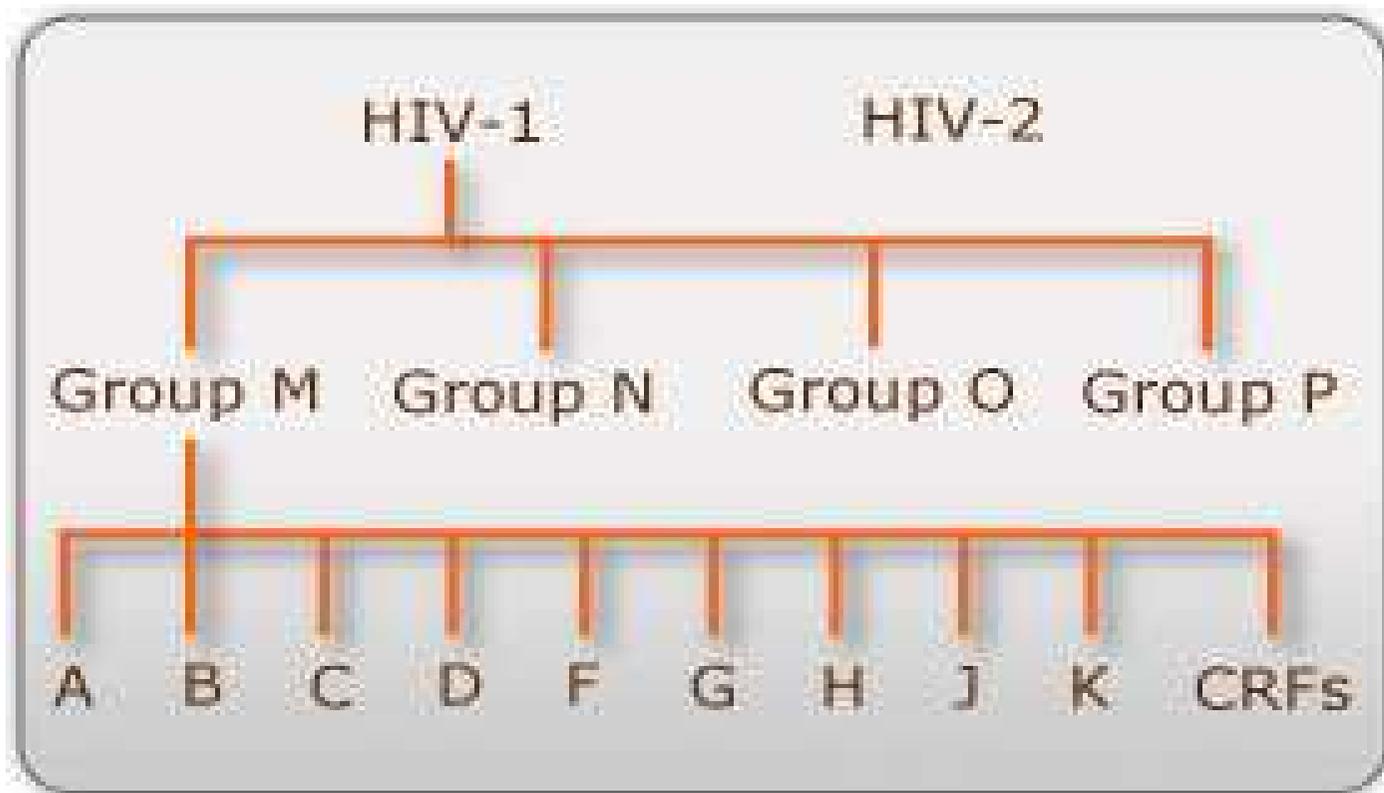


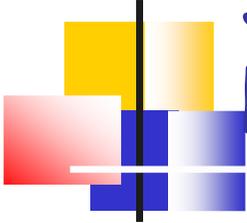
Subtipos virales del HIV 1

- El HIV se divide en tres grupos genéticos: mayor (M), outlier (O) y N (no M ni O)
- Asociado a la variabilidad de los genes *gag* y *env*
- Hay 9 subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J, K
- La epidemia inicial de los 80 se debió al B
- El B sigue siendo más prevalente en USA, Europa y Australia pero el C predomina en el resto del mundo
- Puede haber virus recombinantes con secuencias de varios subtipos



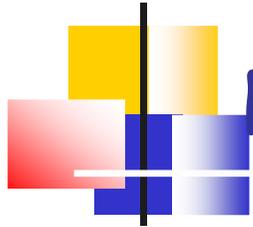
Subtipos virales del HIV 1





Subtipos virales poco frecuentes del HIV 1 y subtipos de HIV 2

- Algunos pacientes de Camerún, Gabón y Guinea Ecuatorial están infectados por virus del grupo O
- Se ha descrito el grupo N en Camerún
- El HIV 2 se divide en 7 subtipos: A, B, C, D, E, F, G
- Los más prevalentes son el A y el B



RESUMEN

- **Cribado: ELISA**
- **Si positivo: Confirmar CON OTRO SUERO Y SIN DECIR NADA AL PACIENTE**
- **Si negativo: Descarta la infección salvo en sospecha clínica de seroconversión**