

Falso negativo en el diagnóstico de VIH-1

P. Díaz Pernas^a, S. Riesco Riesco^a, B. Larrú Martínez^a,
M.A. Muñoz-Fernández^b, S. García-Bujalance^a y M.ªI. de José Gómez^a

^aServicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario La Paz.

^bServicio de Inmunología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

Se presenta un caso de falso negativo en el diagnóstico de infección por virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en una niña de origen africano. Las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN proviral realizadas a los 2 y 4 meses de vida fueron negativas. A los 18 meses, por persistencia de los anticuerpos anti-VIH-1, se realizó una PCR de ARN que resultó positiva, confirmando la infección por VIH-1, subtipo no B, forma recombinante A-G. La prevalencia de los subtipos no B está en aumento en nuestro medio en relación con el fenómeno de la inmigración, ya que un tercio de los extranjeros infectados lo están por subtipos no B y asciende al 70 % de los pacientes africanos. En estos subtipos son más frecuentes los resultados falsos negativos y las discrepancias entre la carga viral y el recuento de linfocitos CD4. Los subtipos no B muestran una mayor tasa de resistencias a los inhibidores de la proteasa, lo que puede tener implicaciones terapéuticas.

Palabras clave:

Infección por VIH-1. Niños. PCR-ADN de VIH. PCR-ARN de VIH.

FALSE NEGATIVE DIAGNOSIS OF HIV-1

We report a case of a false negative diagnosis of HIV-1 infection in an African girl. Two HIV-1 DNA polymerase chain reaction (PCR) tests were negative at the second and fourth months of life. Because anti-HIV antibodies persisted when the patient was 18 months old, the HIV-1 RNA PCR test was performed with a positive result, confirming HIV-1 non-B subtype, recombinant A-G. The prevalence of non-B HIV-1 subtypes are increasing in Spain, which could be related to the phenomenon of immigration. Approximately one-third of HIV-infected foreigners have non-B subtypes and the percentage increases to 70 % of the African population in Spain. In non-B HIV-1 subtypes, false negative results and inconsistencies between viral load and CD4 count are more frequent. These subtypes

also show a higher rate of resistance to protease inhibitors, which can have therapeutic implications.

Key words:

HIV-1 Infection. Children. HIV DNA-PCR. HIV RNA-PCR.

INTRODUCCIÓN

La detección precoz de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en niños es crucial para establecer un correcto seguimiento y tratamiento del paciente, así como para mejorar su pronóstico, evitando las infecciones oportunistas, la diseminación neurológica que produce alteraciones irreversibles y el deterioro inmunológico.

El diagnóstico de infección pediátrica por VIH, de acuerdo a los criterios del Center for Disease Control and Prevention (CDC) de 1994¹, requiere, en los niños menores de 18 meses, 2 resultados positivos, en 2 muestras de sangre diferentes separados una semana, de pruebas directas de virus, siendo la más utilizada la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya sea de ARN o de ADN proviral. Sin embargo, en niños por encima de los 18 meses, el diagnóstico se basa en la serología, con la detección de anticuerpos anti-VIH por la técnica de análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) y confirmados por Western blot. Se descarta de forma razonable la infección por VIH en el niño cuando se obtienen dos resultados negativos de PCR después del primer mes, y al menos uno de ellos es posterior al cuarto mes de vida², comprobando posteriormente la serorreversión.

Se habla de exposición perinatal al VIH en aquel niño menor de 18 meses seropositivo por ELISA y Western blot, hijo de madre infectada y no habiendo existido riesgo de otra vía de infección. La serorreversión se produce en el niño nacido de madre VIH positiva que presenta dos o más pruebas de anticuerpos negativas entre los 6 y 18 meses; basta una prueba si el niño es mayor de 18 meses.

Correspondencia: Dra. M.ªI. de José Gómez.

Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario La Paz.

Pº de la Castellana, 261. 28046 Madrid. España.

Correo electrónico: ijose.hulp@salud.madrid.org

Recibido en noviembre de 2005.

Aceptado para su publicación en marzo de 2006.

Presentamos un paciente en el que el diagnóstico de infección por VIH-1 se realizó tardíamente por presentar dos resultados negativos de ADN proviral a los 2 y a los 4 meses de vida.

PACIENTE

Niña nacida en 2002, tras embarazo no controlado, de madre procedente de Camerún. Parto vaginal, a término. Se desconoce el tiempo de amniorraxis. En la sangre de cordón se detectó serología positiva para VIH, por lo que se inició profilaxis con zidovudina a las 48 h de vida de la niña, manteniéndose durante 6 semanas.

Por riesgo de infección, la paciente fue controlada a los 2, 4, 6, 12 y 18 meses. Las PCR de ADN proviral (Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay Bayer) realizadas a los 2 y 4 meses fueron negativas. Por esta razón se clasificó a la niña como expuesta no infectada, según los criterios del CDC¹ comentados anteriormente.

A los 2 meses de vida la paciente presentaba en el estudio inmunológico una proporción de linfocitos CD4 del 50% (4.200 cél./ μ l).

Los anticuerpos anti-VIH-1 continuaron siendo positivos por encima de los 18 meses. Esto llevó a realizar una nueva PCR, esta vez de ARN (Amplicor HIV-1 Monitor Test 1.5 Roche), que resultó positiva, revelando una carga viral de 243.000 copias/ml. El diagnóstico de infección por VIH se realizó a los 21 meses de vida (tabla 1).

En los posteriores controles inmunológicos la proporción de linfocitos CD4 se encontraban alrededor del 17% (1.000-1.500 cél./ μ l), con una carga viral de 100.000 copias/ml; por esta razón, a los 30 meses de vida de la niña, se inicia tratamiento con triple terapia antirretroviral, con dos análogos de los nucleósidos (zidovudina y lamivudina) y un inhibidor de la proteasa (lopinavir-ritonavir). Tras 20 meses de seguimiento la paciente se encuentra

clínicamente asintomática, con situación inmunológica normal y carga viral indetectable, estando incluida en la clase A1 de la clasificación del CDC para el VIH pediátrico¹.

Se realizó estudio del subtipo viral, con el resultado de VIH-1, grupo M, forma recombinante A-G.

DISCUSIÓN

En el caso presentado, se utiliza inicialmente la PCR del ADN proviral, que está basada en el proceso de transcripción inversa en el que se sintetiza ADN proviral complementario del ARN del VIH-1; este ADN se integra en el cromosoma de la célula mediante la integrasa viral. El ADN proviral persiste en las células mononucleares de sangre periférica y en los ganglios linfáticos a pesar del tratamiento antirretroviral³. Se trata de un método cualitativo, utilizado para cribado y que en la actualidad no se encuentra disponible.

La PCR de ARN es una técnica cuantitativa, que se denomina carga viral. Existen en el mercado dos métodos

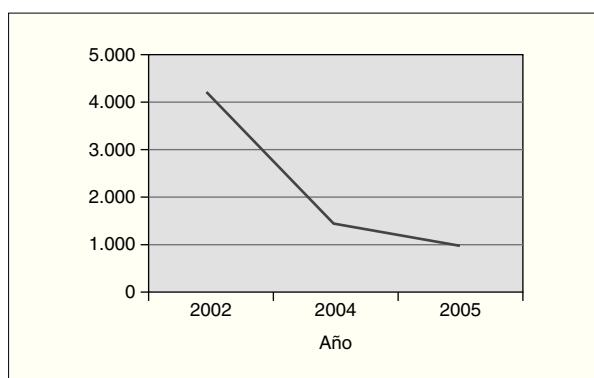


TABLA 1. Resultados analíticos

	Recién nacido	2 meses	6 meses	12 meses	18 meses	21 meses	30 meses	36 meses
PCR-ARN	NR	NR	NR	NR	NR	243.000,0	100.000	Indetectable
PCR-ADN	N	N	N	N	N	N	N	Retirado
ELISA			+	+	+	+	+	+
W-B			+	+	+	+	+	+
Hb	11,3	13	13,3	13,6	12,9	13,3	13	13,2
Leucocitos	13.500	15.490	9.700	17.730	10.270	12.800	11.500	7.810
Linfocitos	8.400	11.340	6.560	13.330	7.000	8.660	8.960	6.540
CD4 (%)	50						17	23
Colesterol	122	109	115	145	176	188	256	252
TGC	96	92	86			103	138	93
GOT	103	70	67	77	38	88	46	33
GPT	184	80	57	165	28	81	19	17
GGT		117	43	78	27	33	27	30

NR: no realizado; N: resultado negativo; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; ELISA: análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas; W-B: Western blot; Hb: hemoglobina; TGC: triglicéridos; GOT: transaminasa glutámico oxalacética; GPT: transaminasa glutámico pirúvica; GGT: gamma-glutamil transpeptidasa.

para detectar el ARN del VIH-1. El aprobado por la Food and Drug Administration (FDA), VIH, ARN, PCR (Amplificador HIV-1 Monitor test 1.5) se basa en la RT-PCR, realizando una transcripción inversa del ARN del gen *gag* y posteriormente la PCR. Y el denominado *branched DNA* o ADN_b (Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay Bayer) que realiza una hibridación de 98 *probes* a diferentes regiones del gen de la polimerasa y su posterior amplificación. En un estudio comparativo se demostró mayor sensibilidad del ADN_b para detectar subtipos no B⁴.

El VIH es un virus de gran variabilidad genética. Existen 2 tipos: VIH-1 y VIH-2. El VIH-2 agrupa 5 subtipos (A-E) y se encuentra principalmente en el oeste de África. Es menos transmisible que el VIH-1 y raramente se contagia por transmisión vertical. Se asocia a una menor carga viral medida por PCR-ARN, y a un descenso de los linfocitos CD4 y una progresión clínica más lentos. Es frecuente que pacientes portadores del VIH-2 estén coinfectados con VIH-1. El VIH-2 no es sensible a los inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa y presenta mayores tasas de resistencias a los inhibidores de la proteasa que el VIH-1. La confirmación de la infección puede ser complicada ya que existen el 20-30% de falsos negativos en la serología por ELISA.

El VIH-1 engloba 3 grupos: M (*major*), O (*outlier*) y N (*non-M, non-O*). El grupo M contiene 10 subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H, J y K) según las secuencias de *env*, *gag* y *pol*; y 4 formas recombinantes (CRF01-AE, CRF02-AG, CRF03-AB y CRF04-cpx)^{5,6}.

El subtipo B del VIH-1 predomina en los países occidentales (América del Norte, Europa), así como en Oriente Medio, Este de Asia y Latinoamérica. El resto de subtipos se denominan como "no B" y son los responsables de la epidemia de sida en los países con recursos limitados; en concreto, en el continente africano se encuentran todos los subtipos no B, con una presencia mínima del subtipo B⁷.

En los últimos años la prevalencia de subtipos no B está en aumento en los países occidentales, en clara relación con el fenómeno de la inmigración. Un tercio de los inmigrantes infectados lo están por subtipos no B, y esta proporción asciende al 70% cuando se trata de personas africanas^{5,7}. En nuestro medio se ha demostrado alta prevalencia de cepas de subtipos G, gran parte de las cuales son formas recombinantes CRF02-AG, al igual que en el caso que presentamos⁸.

Los factores asociados a la infección por subtipos no B son la transmisión heterosexual, origen africano, región geográfica donde se produce la infección y el año del diagnóstico, ya que el haber contraído la infección en los últimos años aumenta la probabilidad de subtipo no B⁶.

En personas infectadas por estos subtipos se ha encontrado mayor frecuencia de pruebas diagnósticas con resultados falsos negativos, así como discrepancias de la carga viral esperada en relación con el recuento de linfocitos CD4 o el estadio clínico. Es decir, en pacientes con disminución en el recuento de linfocitos CD4 o estadio clínico avanzado se encuentran cargas virales inesperadamente bajas. Este fenómeno parece explicarse porque las técnicas diagnósticas utilizadas en nuestro medio están diseñadas basándose en secuencias de subtipos B, que no son lo suficientemente sensibles para detectar otros subtipos diferentes⁹⁻¹³.

En general, no hay evidencia de que los subtipos no B se asocien con una peor respuesta virológica al tratamiento antirretroviral y responden a los análogos de los nucleósidos de la transcriptasa inversa. Sin embargo, muestran altas tasas de polimorfismo en el gen de la proteasa, con sustituciones en posiciones asociadas con resistencias a los inhibidores de la proteasa (IP). Una de estas mutaciones es la M36I, que está presente en el 96% de los subtipos no B, frente al 12% de los subtipos B. Esto condiciona un aumento de resistencias a los IP^{7,14,15}, lo que debe ser valorado al iniciar el tratamiento antirretroviral.

De la experiencia de este caso podemos concluir que es conveniente considerar la posibilidad de infección por subtipos no B en pacientes africanos, ante discrepancias entre carga viral y la situación clínica o el recuento de linfocitos CD4 y, en niños expuestos, con serología de VIH positiva más allá de los 18 meses de vida. En todos estos casos se recomienda el uso de técnicas diagnósticas sensibles para detectar subtipos no B y realizar estudios genotípicos de resistencias del VIH, para elegir la pauta de tratamiento antirretroviral más adecuada.

De la experiencia de este caso podemos concluir que es conveniente considerar la posibilidad de infección por subtipos no B en pacientes africanos, ante discrepancias entre carga viral y la situación clínica o el recuento de linfocitos CD4 y, en niños expuestos, con serología de VIH positiva más allá de los 18 meses de vida. En todos estos casos se recomienda el uso de técnicas diagnósticas sensibles para detectar subtipos no B y realizar estudios genotípicos de resistencias del VIH, para elegir la pauta de tratamiento antirretroviral más adecuada.

BIBLIOGRAFÍA

- Centers for Disease Control and Prevention: 1994 Revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. MMWR. 1994;43:1.
- Moreno Pérez D, García Martín FJ, Vázquez López R, Jurado Ortiz A. Infección perinatal por VIH-1 no esperado. An Pediatr (Barc). 2005;62:598-9.
- Gibellini D, Vitone F, Schiavone P, Ponti C, La Placa M, Re MC. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells by SBYR green real-time PCR technique. J Clin Virol. 2004;29:282-9.
- Elbeik T, Alvord WG, Trichavaroj R, De Souza M, Dewar R, Brown A, et al. Comparative analysis of HIV-1 viral load assays on subtype quantification: Bayer Versant HIV-1 RNA 3.0 versus Roche Amplicor HIV-1 Monitor Versión 1.5. J Acquir Immune Defic Syndr. 2002;29:330-9.
- Holguín A, Aracil B, Álvarez A, Barros C, Soriano V. Prevalence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) non-B subtypes in foreigners living in Madrid, Spain, and comparison of the performances of the Amplicor HIV-1 Monitor versión 1.0 and the new automated version 1.5. J Clin Microbiol. 2001;39:1850-4.
- Snoeck J, Van Laethem K, Hermans P, Van Wijngaerden E, Derdelinckx I, Schrooten Y, et al. Rising prevalence of HIV-1 non-B subtypes in Belgium: 1983-2001. J Acquir Immune Defic Syndr. 2004;35:279-85.

7. Holguín A, Álvarez A, Soriano V. High prevalence of HIV-1 subtype G and natural polymorphisms at the protease gene among HIV-infected immigrants in Madrid. *AIDS*. 2002;16:1163-70.
8. Holguín A, Álvarez A, Soriano V. Heterogeneous nature of HIV-1 recombinants spreading in Southern Europe. *J Med Virol*. 2005;75:374-80.
9. Haas J, Geiss M, Bohler T. False negative polymerase chain reaction-based diagnosis of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in children infected with HIV strains of African origin. *J Infect Dis*. 1996;174:244-5.
10. Jenny-Avital E, Beatrice S. Erroneously low or undetectable plasma immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ribonucleic acid load, determined by polymerase chain reaction, in West African and American patients with non-B subtype HIV-1 infection. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1127-230.
11. Kline N, Schwarzwald H, Kline M. False negative DNA polymerase chain reaction in an infant with subtype C human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;9:885-6.
12. Zaman M. Infection with non-B subtype HIV type 1 complicates management of established infection in adult patients and diagnosis of infection in newborn infants. *Clin Infect Dis*. 2002;34:417.
13. Geelen S, Lange J, Borleffs J, Wolfs T, Weersink A, Schuurman R. Failure to detect a non-B HIV-1 subtype by the HIV-1 Amplicor Monitor test, version 1.5: A case of unexpected vertical transmission. *AIDS*. 2003;17:781-2.
14. Pillay D, Walker S, Gibb D, De Rossi A, Kaye S, Ait-Khaled M, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtypes on virologic response and emergence of drug resistance among children in the paediatric European network for treatment of AIDS (PENTA) 5 Trial. *J Infect Dis*. 2002;186:617-25.
15. Montes B, Vergne L, Peeters M, Reynes J, Delaporte E, Se-gondy M. Comparison of drug resistance mutations and their interpretation in patients infected with non-B HIV-1 variants and matched patients infected with HIV-1 subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;35:329-36.