

Original Breve

Aitziber Aguinaga
Ana Navascués
Isabel Polo
Carmen Ezpeleta

Estudio comparativo de técnicas confirmatorias de anticuerpos frente VIH-1/2: Geenius™ versus INNO-LIA™

Servicio de Microbiología Clínica. Complejo Hospitalario de Navarra,
Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra. IdISNA, Pamplona, Navarra, España.

RESUMEN

Introducción. El objetivo del estudio es comparar dos ensayos confirmatorios de anticuerpos frente a la infección por VIH-1/2.

Material y métodos. Estudio prospectivo (1/1/2015-31/12/2015) en el que se incluyeron muestras de suero con resultados repetidamente positivos en la técnica de cribado *Antigen-antibody assay* HIV-1/2 (Architect, Abbott). En los sueros correspondientes a nuevos diagnósticos se utilizaron las técnicas confirmatorias Geenius™ HIV-1/2 *assay* (Bio-Rad) e INNO-LIA™ HIV-1/2 *score line-immunoassay* (Innogenetics®). La carga viral VIH-1 (Cobas® AmpliPrep/HIV, Roche) se realizó en casos discordantes e indeterminados.

Resultados. Se incluyeron 85 muestras. Los resultados de ambas técnicas confirmatorias fueron concordantes en 80/85 muestras: 53 VIH-1, 1 VIH-2, 25 negativos y 1 indeterminado. El coeficiente de concordancia *Kappa* de *Cohen* fue muy elevado (0,878).

Conclusión. La concordancia entre las dos técnicas evaluadas es muy elevada. El procedimiento para realizar Geenius™ es rápido y sencillo. Geenius™ es una técnica alternativa, útil, a incluir en los algoritmos diagnósticos de infección por VIH-1/2.

Palabras clave: VIH-1, VIH-2, Geenius™, INNO-LIA™, algoritmo diagnóstico.

Comparative study of HIV-1/2 antibody confirmatory assay: Geenius™ versus INNO-LIA™

ABSTRACT

Introduction. The aim of the study is to compare two confirmatory tests for HIV-1/2 infection.

Material and methods. A prospective study was carried out between 01/01/2015 and 12/31/2015. Serum samples with repeatedly positive results in the Antigen-Antibody-HIV-1/2 (Architect, Abbott) screening assay were included. The serum samples corresponding to new diagnosed cases were selected and were used to compare the two confirmatory assays: Geenius™ HIV-1/2 (Bio-Rad) and INNO-LIA™ HIV-1/2 *score line-immunoassay* (Innogenetics®). The HIV-1 viral load (Cobas® AmpliPrep/HIV, Roche) was performed in discordant or indeterminate cases. **Results.** Eighty five samples were included. The results of both confirmatory assays were concordant in 80/85 samples: 53 HIV-1, 1 HIV-2, 25 negative and one indeterminate. Cohen's Kappa concordance coefficient between Geenius™ and INNO-LIA™ techniques was very high (0.878).

Conclusion. The concordance between the two assays is high. The procedure for Geenius™ is simple and fast. Geenius™ is a good alternative to include in the HIV-1/2 diagnostic algorithm.

Key words: HIV-1, HIV2, Geenius™, INNO-LIA™, diagnostic algorithm.

INTRODUCCIÓN

Las guías nacionales¹ e internacionales^{2,3} recomiendan el empleo de algoritmos diagnósticos de VIH-1/2 para identificar infecciones por VIH-1/2, diagnosticar infecciones agudas y diferenciar entre infecciones causadas por el virus VIH-1 o VIH-2. Éstas incluyen técnicas serológicas para la detección de anticuerpos y antígeno p24 así como técnicas moleculares para detectar ARN o ADN proviral.

Correspondencia:
Aitziber Aguinaga Pérez
Servicio de Microbiología Clínica. Complejo Hospitalario de Navarra
Calle de Irunlarrea 3, Pamplona, Navarra (CP: 31008). España.
Teléfono: 848422923.
E-mail: aitziber.aguinaga.perez@cfnavarra.es

El diagnóstico inicial de la infección por el virus VIH-1/2 se realiza mediante la detección de anticuerpos que, ante resultados repetidamente positivos, requieren confirmación con técnicas más específicas. Hasta hace unos años el Western Blot (WB) y el inmunoensayo en línea (LIA) eran las técnicas de referencia para la confirmación y diferenciación de anticuerpos específicos frente a VIH-1 y VIH-2. Las limitaciones más importantes de estas técnicas son su lentitud, laboriosidad, y en algunos casos su lectura e interpretación que es manual y/o subjetiva¹. Una de estas técnicas, ampliamente utilizada es INNO-LIA™ HIV-1/2. INNO-LIA™ HIV-1/2 score line-immunoassay es un inmunoensayo enzimático en tira que detecta anticuerpos específicos frente a VIH-1 (gp120, gp41, p31, p24 y p17) y VIH-2 (gp36 y gp105). Metodológicamente el procedimiento es laborioso (tiempo de incubación: 3 ó 16h), y requiere de personal altamente cualificado.

Geenius™ HIV-1/2 es una inmunocromatografía que detecta anticuerpos específicos frente a VIH-1 (p31, gp160, p24, gp41) y VIH-2 (gp36 y gp140). El procedimiento es sencillo y el tiempo de incubación de la técnica es corto, 30 minutos. La lectura e interpretación del resultado es automática. La utilización de Geenius™ como técnica confirmatoria puede simplificar y agilizar el diagnóstico de la infección por el virus VIH-1/2.

El objetivo del estudio es comparar la eficacia de la técnica confirmatoria de anticuerpos VIH-1/2 Geenius™ HIV-1/2 respecto a INNO-LIA™ HIV-1/2 score line-immunoassay.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio prospectivo desde el 1/01/2015 hasta el 31/12/2015, en el que se incluyeron todos los pacientes con resultado repetidamente positivo en la técnica de cribado.

En nuestro Servicio realizamos como cribado un enzimoimmunoanálisis de cuarta generación, *HIV Antigen-Antibody*

dy Combo assay (Architect, Abbott, Wiesbaden, Germany). Ésta técnica detecta anticuerpos IgG/M frente VIH-1/2 y antígeno p24. Ante un resultado repetidamente positivo, realizamos como técnica confirmatoria INNO-LIA™ HIV-1/2 score line-immunoassay (Innogenetics®, Gent, Belgium).

Durante el estudio realizamos en paralelo Geenius™ HIV-1/2 (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) e INNO-LIA™ HIV-1/2 score line-immunoassay. En los casos en los que se obtuvieron resultados discordantes entre ambas técnicas confirmatorias, o entre el resultado de la serología de cribado y las técnicas confirmatorias, se solicitó una nueva muestra de suero para repetir serología y de plasma para realizar carga viral de VIH-1. Los pacientes fueron monitorizados clínicamente y serológicamente un mínimo de 6 meses.

El algoritmo diagnóstico se realizó en todas las muestras con resultado de cribado positivo de pacientes cuyo estado de VIH era desconocido en nuestro centro.

La lectura e interpretación de los resultados de ambas técnicas se realiza de forma automática, siguiendo los criterios de la OMS, CDC y Cruz Roja Americana.

La carga viral VIH-1 se determinó mediante PCR a tiempo real (Cobas® AmpliPrep/HIV, c6800, Roche, Mannheim, Germany).

La comparación entre las 2 técnicas evaluadas se realizó mediante el coeficiente de concordancia *kappa* de Cohen.

RESULTADOS

Durante el año 2015 se procesaron 22.465 muestras para descartar la presencia de anticuerpos de VIH-1/2. De estas, 189 tuvieron un valor positivo repetido en la técnica de cribado. Tras la selección de una muestra por paciente y eliminación de muestras de pacientes VIH conocidos, se incluyeron 88 mues-

Tabla 1 Pacientes con resultados discordantes en las técnicas confirmatorias.

Paciente	Inmunoensayo valor (S/CO)	Técnica confirmatoria	Resultado	gp41	p31	p24	gp36	Carga viral VIH-1 (log)	Monitorización
6	1,95	INNO-LIA™	IND	N	N	P	N	ARN	No confirmada
		Geenius™	N	N	N	N	No detectado	infección VIH-1	
10	542,01	INNO-LIA™	IND	P	P	IND	N	5,57	Confirmada
		Geenius™	P	P	N	N	infección VIH-1		
61	110,03	INNO-LIA™	IND	P	N	N	N	5,03	Confirmada
		Geenius™	N	N	N	N	infección VIH-1		
78	2,51	INNO-LIA™	N	N	N	N	N	ARN	No confirmada
		Geenius™	IND	P	N	N	N	No detectado	infección VIH-1
81	1,89	INNO-LIA™	N	N	N	N	N	ARN	No confirmada
		Geenius™	IND	P	N	N	N	No detectado	infección VIH-1

IND =Indeterminado, P= Positivo, N = Negativo

Tabla 2 Discordancia entre los anticuerpos específicos comunes detectados por INNO-LIA™ y Geenius™, y repercusión de los mismos sobre el resultado global de la técnica e infección por VIH-1/2.

Pacientes	Infección VIH	Resultado INNO-LIA™	Resultado Geenius™	Discrepancia entre detección de anticuerpo específico		
				Antígeno	INNO-LIA™	Geenius™
6	N	IND	N	p24	P	N
10	P	IND	P	p31	P	N
				p24	IND	N
11, 96	P	P	P	p31	P	N
				p24	P	N
13, 14, 37, 38, 41, 77, 91, 96	P	P	P	p31	P	N
15, 24, 45, 47, 79, 83, 87, 88, 65	P	P	P	p24	P	N
36	P	P	P	p31	IND	N
				p24	P	N
61	P	IND	N	gp41	P	N
68	P	P	P	gp36	N	P
71	P	P	P	p31	N	P
78	N	N	IND	gp41	N	P
81	N	N	IND	gp41	N	P

IND =Indeterminado, P= Positivo, N = Negativo

tras para valorar las técnicas confirmatorias. La edad media de los pacientes fue de 37 años (desviación típica 13 años). Un 62% fueron varones.

Finalmente pudo realizarse la comparación en 85 de las 88 muestras. Los resultados de ambas técnicas fueron concordantes en 80 muestras: 53 fueron infecciones por VIH-1, 1 por VIH-2, 25 fueron negativos y 1 fue indeterminado. El coeficiente de concordancia *Kappa* de *Cohen* entre las técnicas Geenius™ e INNO-LIA™ fue muy elevado (0,878). En 5 de los 85 casos los resultados entre ambas técnicas fueron discordantes (tabla 1).

Un 4,1 % de las determinaciones realizadas fueron indeterminadas: 4,7% (4/85) mediante INNO-LIA™ y 3,5% (3/85) mediante Geenius™.

Uno de los pacientes, paciente 5, tuvo una serología positiva (valor 21,46 S/CO) con resultado indeterminado en ambas técnicas confirmatorias (positiva la banda gp41 en Geenius™ e INNO-LIA™) y carga viral VIH-1 negativa. El paciente, sin clínica relacionada, continúa en seguimiento.

En la tabla 2 se describen las discordancias observadas entre las bandas comunes a ambas técnicas (gp41, p31, p24 y gp36), su implicación en el resultado de la técnica confirmatoria y en el diagnóstico de infección por VIH-1/2. En 27 de las 85 muestras evaluadas se observaron discrepancias entre alguna de las bandas. Las diferencias se observaron principalmente en las bandas p31 y p24. En la mayoría de las muestras, en 22, las discrepancias no tuvieron repercusión en el diagnóstico de VIH-1/2.

Una de las principales discrepancias con repercusión direc-

ta en el diagnóstico VIH se dio en el paciente 61. Se observó una variación en la detección de la banda gp41, siendo INNO-LIA™ indeterminado y Geenius™ negativo. En el seguimiento realizado a las 3 semanas se confirmó una infección aguda por VIH-1 (carga viral: logaritmo 5,57 copias/mL).

DISCUSIÓN

Los nuevos algoritmos diagnósticos de VIH-1/2 ya no incluyen el WB como técnica confirmatoria, sino que incorporan inmunoensayos capaces de diferenciar VIH-1/2 y confirmar precozmente la infección por VIH¹⁻³. Estos algoritmos incluyen técnicas moleculares para diagnosticar precozmente las infecciones agudas. La presencia de >5.000 copias ARN/mL permite confirmar la infección por VIH antes de que se produzca la seroconversión⁴.

Nuestros resultados muestran una concordancia excelente entre las técnicas confirmatorias evaluadas, INNO-LIA™ y Geenius™. Diferentes autores han evaluado la sensibilidad, especificidad y concordancia de Geenius™ con diferentes sistemas comerciales (RIBA stripimmunoblot HIV-1/2, MP HIV Blot 2.2, Multispot HIV-1/2, INNO-LIA™). En todos estos estudios se muestra una buena concordancia entre dichas técnicas y Geenius™, así como una alta sensibilidad y especificidad⁵⁻⁸. De hecho, tanto Montesinos et al⁷ como Mor et al⁸ obtienen una sensibilidad diagnóstica mayor que con WB. Las mayores discrepancias observadas entre ambas técnicas confirmatorias se muestran en pacientes con infección aguda. En nuestra serie, esto se observa en los pacientes 10 y 61.

Los resultados indeterminados oscilan entre 3-50% según el tipo de paciente (donante, población general, embarazadas, etc.), país y/o región, tipo de técnica y algoritmo diagnóstico⁹. En nuestra población, un 4,1% de las determinaciones tuvieron resultado indeterminado, sin apenas diferencia entre las técnicas empleadas: 4 casos mediante INNO-LIA™ y 3 mediante Geenius™. Diferentes autores han mostrado que la técnica Geenius™ reduce el número de indeterminados, en comparación con técnicas de WB^{5,7,8}. Nuestros resultados no muestran dicha observación probablemente debido a un menor número de muestras incluidas.

Las principales discrepancias entre los anticuerpos específicos detectados por ambas técnicas se observan en p24 y p31. Abbate et al¹⁰ observaron una pérdida de detección del anticuerpo frente a p31 tanto en Geenius™ como en New LAV I y II. Esto ocurría tanto en pacientes con infección aguda como en crónicos, sugiriendo que estos anticuerpos pueden perderse progresivamente o no detectarse en casos determinados¹⁰. Nosotros encontramos pérdida de detección de este anticuerpo en Geenius™, no así en INNO-LIA™.

La detección única de la banda p24, es la más frecuentemente detectada como reacción inespecífica en WB¹¹. Estas reacciones inespecíficas pueden estar relacionadas con características de los pacientes y sus enfermedades infecciosas o bien otras condiciones clínicas (enfermedades autoinmunes, enfermedad oncológica, etc), características de la técnica de confirmación y su procesamiento⁹. También han sido relacionadas con reacción cruzada con proteínas del core de picornavirus u otros retrovirus¹².

Las causas de patrones de WB indeterminados son desconocidas aunque se han relacionado con la presencia de sueros inactivados por calor, sueros hemolizados, alta concentración de bilirrubina en suero, presencia de factor reumatoide, lupus eritematoso, gammapatías monoclonales, etc^{1,9}.

Conocer la reacción concreta de los distintos anticuerpos puede ser fundamental para valorar posibles reacciones inespecíficas (ej. p24) o estadios precoces de infección (ej. gp41 o gp120). Los anticuerpos frente a gp41, son los primeros que se detectan, pocos días después de la viremia¹³. Schüpbach et al.¹⁴ han desarrollado algoritmos para diferenciar si la infección por VIH-1 es reciente en función de la intensidad de la reacción antígeno-anticuerpo y las bandas detectadas.

Con independencia de los resultados obtenidos en las técnicas confirmatorias, indeterminados o negativos, tal y como observamos en el paciente 61 de nuestra serie, siempre que se sospeche una infección aguda debe realizarse una determinación de carga viral y un seguimiento serológico en el tiempo¹⁻³. La utilización de técnicas serológicas de cuarta generación ha permitido aumentar la sensibilidad diagnóstica y recortar el periodo ventana post-infección respecto a las técnicas de primera, segunda, tercera generación y los WB, pero no lo suprimen. Esto hace que, debido a la dinámica de la infección, en caso de sospecha de infección aguda la única herramienta diagnóstica útil es la carga viral.

Una de las ventajas de nuestro estudio es que es prospecti-

vo, las técnicas se realizaron en paralelo, con la misma muestra e idénticas condiciones.

Se requiere de mayor número de muestras para valorar la eficacia de la técnica en los casos indeterminados e infecciones agudas.

Debería realizarse un estudio específico de coste-eficacia, valorando costes directos e indirectos, así como la eficiencia de la técnica.

El procedimiento de la técnica Geenius™, es muy sencillo y conlleva poco tiempo de realización. Geenius™ permite confirmar el diagnóstico de VIH-1/2 de forma rápida

Este trabajo muestra la elevada concordancia entre ambas técnicas confirmatorias considerándose a Geenius™ una alternativa óptima para incluir en los algoritmos diagnósticos de la infección por VIH-1/2.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez Estévez M, Reina González G, Aguilera Guirao A, Rodríguez Martín C, García García F. Microbiological diagnosis of human immunodeficiency virus infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015;33(8):e44-52.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Criteria for Laboratory testing and diagnosis of Human Immunodeficiency Virus infection: Approved guideline. CLSI document M53-A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
3. Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories. Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection: Updated Recommendations. 2014. Disponible en: <http://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447>
4. Cohen MS, Gay CL, Busch MP, Hecht FM. The detection of acute HIV infection. *J Infect Dis* 2010;202 (Suppl 2):270S-75S. Hawthorne Halle A, Samuelson A, Nordin M, Albert J, Bogdanovic G. Evaluation of Bio-Rad Geenius HIV-1 and-2 assay as confirmatory assay for detection of HIV-1 and -2 antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 2014;21(8):1192-4.
6. Malloch L, Kadivar K, Putz J, Levett PN, Tang J, Hachette TF et al.. Comparative evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV-1/2 Confirmatory Assay and the Bio-Rad Multispot HIV-1/2 Rapid Test as an alternative differentiation assay for CLSI M53 algorithm-I. *J Clin Virol* 2013;58 (Suppl 1):e85-91.
7. Montesinos I, Eykmans J, Delforge ML. Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV-1/2 test as a confirmatory assay. *J Clin Virol* 2014;60:399-401.

8. Mor O, Mileguir F, Michaeli M, Levy I, Mendelson E. Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV 1/20 assay as an alternative to the INNO-LIA HIV 1/2 assay for confirmation of HIV infection. *J Clin Microbiol* 2014;52(7):2677-9.
9. Guan M. Frequency, causes, and new challenges of indeterminate results in Western blot confirmatory testing for antibodies to human immunodeficiency virus. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(6):649-59.
10. Abbate I, Pergola C, Pisciotto M, Sciamanna R, Sias C, Orchi N et al. Evaluation in a clinical setting of the performances of a new rapid confirmatory assay for HIV1/2 serodiagnosis. *J Clin Virol* 2014;61(1):166-9.
11. Migali E, Mariotti D, Lovari A, Tenani T, Imperiali P, Ozzola G. HIV-1: absence of infection in subjects with indeterminate western blot. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1993;21(2):61-5.
12. Pollet DE, Saman EL, Peeters DC, Warmenbol HM, Heyndrickx LM, Wouters CJ et al. Confirmation and differentiation of antibodies to human immunodeficiency virus 1 and 2 with a strip-based assay including recombinant antigens and synthetic peptides. *Clin Chem* 1991;37(10 Pt 1):1700-7.
13. Overbaugh J, Morris L. The Antibody Response against HIV-1. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2(1):a007039.
14. Schüpbach J, Gebhardt MD, Tomasik Z, Niederhauser C, Yerly S, Bürgisser P et al. Assessment of recent HIV-1 infection by a line immunoassay for HIV-1/2 confirmation. *PLoS Med* 2007;4(12):e343.