

Microorganismos más frecuentes en pacientes con virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) positivos cubanos con elevados niveles de carga viral

Aileen González-Rizo,* Sara Palma-Monroy,* Randelys Molina-Castro,** Yainais Borrero-Rivero,* Yaimara Fernández de Castro-Céspedes,* Thaimí Pinillos-Saavedra,* Beltrán Velásquez-Viamontes*

RESUMEN

Los niveles de ácido ribonucleico (ARN) virales en plasma o suero en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) ha sido uno de los marcadores de progresión más importantes. Se realizó un estudio descriptivo con el objetivo de determinar la frecuencia de los microorganismos que infectaban a 200 pacientes VIH+ con elevados niveles de carga viral y su relación con los valores de linfocitos T CD4+. Los niveles de ARN virales oscilaban entre las 61,000 a 830,000 copias/mL. Los estudios microbiológicos arrojaron que *Streptococcus* grupo D (13%), seguido por *Streptococcus* grupo A (5%), *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (3%) fueron los microorganismos predominantes a partir de muestras respiratorias. El 8% de las muestras de esputo analizadas fueron positivas a la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes. Un 13% de las muestras de líquido cefalorraquídeo fueron positivas a la presencia de *Cryptococcus*. *Giardia lamblia* e *Isospora belli* (3% c/u) fueron los parásitos más frecuentes, seguidos por *Fasciola hepatica*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli* y *Cryptosporidium parvum* (1% c/u). La mayor positividad de las muestras analizadas estuvo vinculada con porcentajes de linfocitos T CD4+ menores que 240 células/ μ L. No se observó la presencia de microorganismos patógenos en muestras procedentes de pacientes cuyos conteos de CD4 estuvieron entre 560-746 células/ μ L.

Palabras clave: ARN viral, VIH-1, agentes infecciosos, células T CD4+.

ABSTRACT

The viral ribonucleic acid (RNA) level in plasma or serum of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) infected patients has become an important disease progression marker. A descriptive study of the microorganisms frequency infected 200 Cuban HIV-1 patients with high viral loads was achieved. The viral loads were determined by Nuclisens system and the CD4 + T lymphocytes count by flow cytometry. The HIV-1 viral loads ranged from 61,000 to 830,000 cp/mL and the median was 150,000 cp/mL. The microbiological studies showed that *Streptococcus* group D (13%), followed by *Streptococcus* group A (5%), *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (3%) were the predominant isolates in respiratory samples. The 8% of the analyzed sputa were positive to Acid Fast Bacilli. A 13% of cerebrospinal fluid samples were positive to the presence of *Cryptococcus*. *Giardia lamblia* and *Isospora belli* (3% each) were the most frequent parasites found, followed by *Fasciola hepatica*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli* and *Cryptosporidium parvum* (1% each). The highest positivity of the analyzed samples was associated to a CD4 + T lymphocytes percentage lower than 240 cell/ μ L. No pathogenic microorganisms were isolated from patients with CD4 + T lymphocytes counts between 560-746 cell/ μ L.

Key words: HIV-1, ARN, infectious agents, CD4+ T cell.

* Laboratorio de Microbiología Diagnóstico, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), Ciudad de La Habana, Cuba.

** Laboratorio de Diagnóstico Clínico, IPK, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia:

Lic. Aileen González
Calle 35B Núm. 72 apto. 23 entre 250 y 246, San Agustín, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.
e-mail: aileen@ipk.sld.cu

Recibido: 14-09-2005

Aceptado: 06-09-2006

INTRODUCCIÓN

Las personas infectadas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) presentan un mayor riesgo de contraer enfermedades causadas por bacterias, parásitos y hongos.¹ Las afecciones del tracto respiratorio y las manifestaciones gastrointestinales son comunes en estos pacientes y, las mismas pueden ser causadas por una gran variedad de agentes patógenos.^{1,2} Esta patología se encuentra entre las primeras manifestaciones clínicas del VIH y son más frecuentes en pacientes con una inmunodepresión severa.²

El principal factor que conlleva a la disminución de los linfocitos T CD4+ es la replicación viral persistente en todos los estadios de la infección por VIH, por lo que los niveles de ácido ribonucleico (ARN) virales en plasma o suero constituyen uno de los marcadores más importantes como pronóstico del desarrollo de la enfermedad.³ Se ha observado un mayor deterioro del sistema inmune en aquellos pacientes que presentan elevados niveles de carga viral, y por lo tanto poseen una menor capacidad de respuesta contra los agentes infecciosos, lo que en muchos casos puede conducir a la muerte del paciente.³

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, en este estudio se propuso conocer cuáles eran los microorganismos más frecuentes en pacientes cubanos VIH positivos que presentaban elevados niveles de ARN viral y su relación con el conteo de células T CD4+.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Se revisaron las historias clínicas de 200 pacientes que presentaban elevados valores de carga viral ($> 55,000 \text{ cp/mL}$), los cuales fueron hospitalizados y posteriormente atendidos ambulatoriamente en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" durante el periodo de enero a noviembre del 2003.

Determinación de los niveles de ARN de VIH-1

Se utilizaron $200 \mu\text{L}$ de plasma por cada paciente para la determinación de los niveles de ARN virales por el sistema Nuclisens (Biomérieux, France). El aislamiento del ácido nucleico se llevó a cabo mediante un procedimiento completamente automatizado utilizando para ello el equipo de aislamiento automatizado Nuclisens extractor (Biomérieux, France) y los reactivos necesarios para dicho procedimiento.⁴

Del extracto de ácido nucleico obtenido se utilizaron $5 \mu\text{L}$ para la amplificación mediante NASBA (Biomérieux, France)⁵ procedimiento realizado según las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN amplificado fue determinado en la lectura final mediante electroquimioluminiscencia⁶ utilizando para ello, el lector Nuclisens Reader (Biomérieux, France).

Estudios microbiológicos

Se revisaron y analizaron los resultados obtenidos a partir de muestras respiratorias, esputos para determinar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes, hemocultivos, fluido cerebroespinal y estudios coproparasitológicos. Los estudios microbiológicos y parasitológicos fueron llevados a cabo en el Centro de Referencia de Microbiología del Instituto, el cual utiliza técnicas validadas, sensibles y específicas.

Cuantificación de los linfocitos T CD4+

Los conteos relativos de linfocitos T CD4+ fueron determinados por citometría de flujo, utilizando un equipo FACSCan, reactivos Tritest y el programa Multiset siguiendo las instrucciones del fabricante (Becton Dickinson).⁷

Análisis estadístico

Los resultados de la carga viral fueron analizados utilizando el paquete estadístico de Microsoft Excel (Microsoft Office, EU), calculando la media de los valores de ARN virales obtenidos. Para describir a los microorganismos reportados se utilizaron frecuencias y porcentajes.

RESULTADOS

Los niveles de ARN virales en los pacientes estudiados oscilaron entre 61,000 y 830,000 cp/mL y la media fue de 150,000 cp/mL.

Los estudios microbiológicos realizados arrojaron que el *Streptococcus* grupo D (13%), fue la bacteria más frecuente aislada en muestras de origen respiratorio seguida por *Streptococcus* grupo A (5%), *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (3%) (Figura 1). Solamente el 8% de las muestras de esputo analizadas fueron positivas a la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes.

En el 3% de las muestras de hemocultivos se determinó la presencia de *Staphylococcus xylosus* y *Salmonella paratyphi* B. El 13% de las muestras de líquido

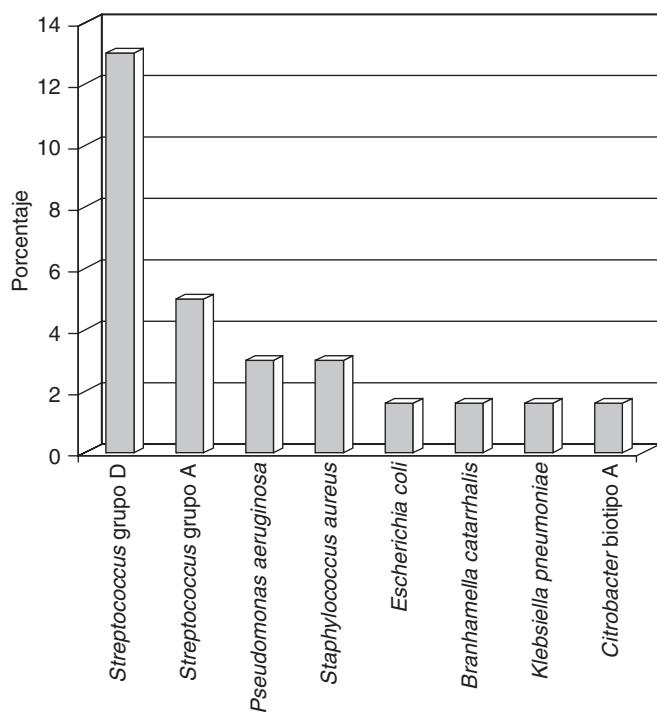


Figura 1. Frecuencia de los aislamientos bacterianos de muestras respiratorias de pacientes VIH positivos con elevados niveles de carga viral.

cefalorraquídeo analizadas fueron positivas a la presencia de *Cryptococcus sp.*

La frecuencia de parasitosis en los pacientes estudiados fue baja. Los parásitos más frecuentes fueron *Blastocystis hominis* (5%) y *Endolimax nana* (4%). Por otro lado, dentro de los patógenos clásicos se encontraron, *Giardia lamblia* e *Isospora belli* (3% c/u), (*Figura 2*).

En el *cuadro I* se muestran los valores en porcentaje de los conteos relativos de los linfocitos T CD4+. Un elevado número de pacientes (83%) presentaron conteos de linfocitos T CD4+ menores de 240 células/ μ L. Los conteos de CD4+ en el resto de los pacientes que presentaron alguna infección, se encontraban entre 250 a 530 células/ μ L. No se observó la presencia de microorganismos patógenos en aquéllos cuyos conteos de linfocitos T CD4+ fueron mayores que 560 células/ μ L.

DISCUSIÓN

Las infecciones bacterianas del tracto respiratorio son frecuentes en personas VIH positivas y las mismas pueden ser causadas por una gran variedad de patógenos. La incidencia y severidad de dichas infec-

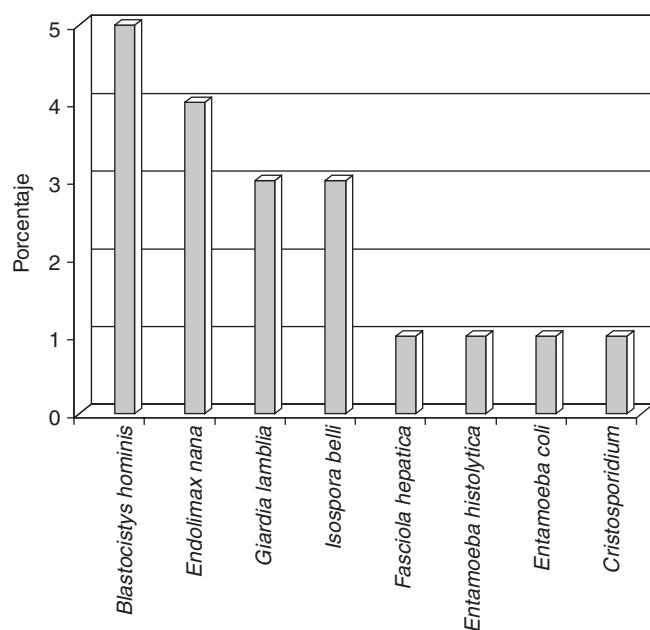


Figura 2. Frecuencia de parásitos entéricos en pacientes con elevados niveles de carga viral.

Cuadro I. Porcentaje de linfocitos T CD4+ de pacientes con elevados niveles de carga viral.

Pacientes (%)	Linfocitos T CD4+		
	< 14% (4-240 células/ μ L)	14-25% (250-530 células/ μ L)	>25% (560-746 células/ μ L)
83	83	14.5	2.5

ciones depende mucho del grado de inmunodepresión presentado por cada paciente;¹ por lo tanto, las infecciones causadas tanto por bacterias como por micobacterias contribuyen al incremento de la morbilidad y mortalidad en estos pacientes.⁸

El género *Streptococcus* fue el más común a partir de muestras de origen respiratorio en los pacientes VIH positivos que presentaron elevados niveles de ARN virales (mayores de 55,000 cp/mL). Otros estudios reafirman la elevada incidencia de bacterias pertenecientes a este género, así como de *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* en estos pacientes.⁹ Por otra parte, Afessa y Grun (2000)¹⁰ encontraron una elevada prevalencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en el tracto respiratorio de estos pacientes (2%). En este sentido, los pacientes con bajos conteos de linfocitos T CD4+ producen un elevado nivel de anticuerpos contra los antígenos bacteriales.

nos en comparación con aquellos que presentan valores comprendidos entre las 200 y 400 células/mL. Esta respuesta contra algunas bacterias extracelulares está caracterizada, por una parte, por un incremento de estos niveles de anticuerpos y por la otra, por un decremento de la afinidad de estos anticuerpos.¹¹ Esto explica porqué la respuesta en estos pacientes con bajos conteos de linfocitos T CD4+ es defectuosa.

En nuestro estudio la mayor frecuencia de los aislamientos bacterianos procedían de pacientes con bajos conteos de linfocitos T CD4+, debido a que su sistema inmune ya no se encontraba en condiciones de responder de una forma adecuada ante la agresión de los microorganismos. Esta inmunodepresión presente en estos pacientes condiciona una predisposición a la adquisición de micobacteriosis, sobre todo en etapas avanzadas de la enfermedad, donde las infecciones por micobacterias son frecuentes. Los elevados valores de carga viral incrementan la diversidad del VIH-1 y producen cambios en los niveles de citocinas en individuos VIH positivos con tuberculosis, lo cual parece estar vinculado con una estimulación inmune localizada.¹² En comparación con otros artículos se obtuvo una baja incidencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en muestras de esputos. Kumar y cols., en el año 2002¹³ reportan un por ciento de positividad más elevado (24.1%). En 1999, Oh y cols.,¹⁴ determinando la frecuencia y tipos de infecciones oportunistas en pacientes VIH positivos en Corea del Sur, observaron la tuberculosis como la más frecuente (25%). Históricamente esta enfermedad no ha presentado un incremento importante entre los pacientes VIH+ cubanos, la misma presenta una baja prevalencia entre la población cubana ($7 \times 100,000$ habitantes).¹⁵ La presencia de estos microorganismos en nuestro medio es baja debido al gran impacto que ha tenido el programa cubano de tuberculosis.¹⁶

Dentro de las infecciones oportunistas que más afectan a estos pacientes se encuentra la meningitis producida por *Cryptococcus*.^{17,18} Se ha podido constatar que en pacientes con elevados niveles de ARN virales y bajos conteos de células T CD4+, esta enfermedad es más frecuente. Sin embargo, no se encuentran episodios de meningitis producida por *Cryptococcus* en pacientes en los cuales se incrementan los conteos de linfocitos T CD4+ (mayores de 100 células/ μL) y poseen niveles indetectables de carga viral. En nuestro estudio, sólo el 13% de los líquidos cefalorraquídeos estudiados fueron positivos a la presencia de *Cryptococcus*, estas muestras procedían de pacientes que presentaban conteos de linfocitos T CD4+ meno-

res de 240 cel/ μL . Este resultado nos puede indicar que el deterioro del sistema inmune es un factor para desarrollar esta infección.

Desde que los primeros casos de síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) fueron descritos, se ha reportado una alta prevalencia de manifestaciones gastrointestinales. En estadios tardíos de la enfermedad, progresan las alteraciones de los mecanismos de defensa inespecíficos para la producción de IgA y se manifiesta una reducción en la respuesta inmune local, aumentando la susceptibilidad frente a patógenos oportunistas intestinales.² A pesar de su alta prevalencia, los protozoos clásicos, como la *Giardia lamblia* y la *Entamoeba histolytica*, no son detectados frecuentemente en pacientes VIH positivos y no son considerados infecciones oportunistas en el SIDA.² La tasa de prevalencia de diarrea causada por estos patógenos en pacientes SIDA es más alta que en aquéllos VIH+ en estadios menos avanzados debido a la deficiente respuesta inmune humoral.¹⁹ En nuestro estudio, los pacientes con *Giardia lamblia* (4%) fueron más numerosos que aquéllos con *Entamoeba histolytica* (1%). Al respecto, en Cuba no se ha encontrado diferencia entre la prevalencia de estos parásitos en las poblaciones VIH+ y no VIH+.²⁰

La criptosporidiosis está distribuida por todos los continentes y usualmente causa diarrea intermitente y crónica en los pacientes aquejados. La intensidad y duración de la diarrea están estrechamente relacionadas con los conteos de linfocitos T CD4+². En Cuba, el *Cryptosporidium spp* fue el patógeno oportunitista de mayor prevalencia entre los pacientes con SIDA en estudio llevado a cabo en 67 sujetos con la enfermedad en 1999 (11.9%).²⁰ En nuestro estudio solamente el 1% de las muestras estudiadas provenientes de 200 pacientes fueron positivas a la presencia de *Cryptosporidium spp*. Otros reportes muestran una tasa de criptosporidiosis un poco más alta, como Brasil (3.5%)² y la India (10.8%).²¹

Por otro lado, la *Isospora belli* se encuentra en áreas tropicales y subtropicales y tiene una tasa de ocurrencia del 15% en Haití, 0.2% en EUA, 1.8% en Brasil.² En la India, Joshi y cols.²¹ han reportado la *Isospora belli* como el parásito más común (17%), seguido por *Entamoeba histolytica* (14.9%) y *Cryptosporidium* (8.5%).² Nosotros encontramos que *Isospora belli* y *Giardia lamblia* fueron los patógenos intestinales mayormente diseminados entre estos pacientes (3%). En 1999, la *Isospora belli* tuvo una prevalencia de sólo un 1.5% en los pacientes cubanos con SIDA.²⁰ Estos resultados apoyan el hecho de una baja fre-

cuencia de estos patógenos en pacientes cubanos con altos niveles de ARN virales.

Las muestras positivas de los estudios microbiológicos pertenecían a pacientes con una severa inmunodepresión (conteos de linfocitos T CD4+ menores de un 14%), los pacientes con elevadas cargas virales y conteos de linfocitos T CD4+ por encima de un 25% no padecían infecciones oportunistas. Se ha descrito que las elevadas cargas virales en estos pacientes influyen en la disminución de las células T CD4+. Los pacientes con una infección por VIH avanzada, que están severamente inmunodeprimidos, desarrollan una variedad de infecciones oportunistas que tienen un impacto significativo en su calidad de vida y supervivencia.²²

En este trabajo, las infecciones oportunistas no fueron frecuentes en pacientes con altos niveles de carga viral y bajos conteos de linfocitos T CD4+, comparadas con lo reportado en otros países; esto puede ser debido a que en Cuba, las políticas de salud instruyen a estos pacientes con una adecuada información acerca de su enfermedad, cómo convivir con ella y el cuidado que deben tener para la prevención de otras enfermedades secundarias que los pueden afectar ya que es conocido que el riesgo de adquisición de infecciones oportunistas depende del estado inmunitario hospedero, así como de la exposición a patógenos potenciales y la virulencia de los mismos.

REFERENCIAS

- Mayaud C, Parrat A, Cadranel J. Pyogenic bacterial lower respiratory tract infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Eur Respir J Suppl* 2002; 36: 28s-39s.
- Cimerman S, Cimerman B, Salomao D. Enteric parasite and AIDS. *Sao Paulo Med* 1999; 117: 266-273.
- de Baar M P, van Dooren M W, de Roij E, Bakker M, van Gemen B, Goudsmit J, et al. A single rapid real-time monitored isothermal RNA amplification assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 isolates from groups M, N and O. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1378-1384.
- Boom R, Sol CJ, Salimars MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.
- Bruisten S, van Gemen B, Koppelman M, Rasch M, van Strijp D, Schukkink R, et al. Detection of HIV-1 distribution in different blood fractions of HIV-1 seropositive persons by two nucleic acid amplification assay. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9: 259-265.
- Bruisten SM, Oudshoorn P, van Swieten P, Boeser-Nunnink B, van Aarle P, Tondreau SP, et al. Stability of HIV-1 RNA in blood during specimen handling and storage prior to amplification by NASBA- QT. *J Virol Methods* 1997; 67: 199-207.
- Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4 T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; 5: 512-517.
- Wolff AJ, O'Donell AE. HIV-related pulmonary infections: a review of recent literature. *Curr Opin Med* 2003; 9: 210-214.
- Schneider RF. Bacterial pneumonia. *Semin Respir Infect* 1999; 14: 327-332.
- Afessa B, Grun B. Bacterial pneumonia in hospitalized patients with HIV infection: pulmonary complications, ICU support and prognostic factors of hospitalized patients with HIV (PIP) study. *Chest* 2000; 117: 1017-1022.
- Kulakov AV, Pinegin BV, Karsonova MI, Papuashvili MN, Prokopenko VD, Simonova AV, et al. Some peculiarities of humoral antibacterial immunity in HIV-infected and AIDS patients. *Russ J Immunol* 1998; 3: 29-36.
- Collins KR, Quinones-Mateu ME, Toossi Z, Arts EJ. Impact of tuberculosis on HIV-1 replication, diversity and diseases progression. *AIDS Rev* 2002; 4: 165-176.
- Kumar P, Sharma N, Sharma NC, Patnaik S. Clinical profile of tuberculosis in patients with HIV infection/AIDS. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2002; 44: 159-163.
- Oh M, Park S, Kim H, Kim U, Kim N, Choi H, et al. Spectrum of opportunistic infections and malignancies in patients with human immunodeficiency virus in South Korea. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1524-1528.
- Bolipk. Dirección Nacional de Epidemiología Ministerio de Salud Pública. 2004; 14.03: 17.
- Marrero FA, Carreras CL, Valdivia ÁJA, Montoso CE, González OE, Torres PR, et al. Programa Nacional de control de la tuberculosis en Cuba. Proyecto de colaboración con el Instituto Municipal de Salud Pública de Barcelona: Colectivos de Autores Editorial de Ciencias Médicas; 1999: 107.
- Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Anunnatsiri S, Chokswadphinyok. The efficacy of fluconazole 600 mg as consolidation therapy of cryptococcal meningitis in AIDS patients. *J Med Assoc Thai* 2003; 86: 293-298.
- Vibhagool A, Sungknopparn S, Mootsikapum P, Chetchotisakd P, Tansuphaswaswadikul S, Bowonwatanuwong C, et al. Discontinuation of secondary prophylaxis for cryptococcal meningitis in human immunodeficiency virus infected patients treated with highly active antiretroviral therapy: a prospective multicenter randomized study. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1329-1331.
- Moolasart P. *Giardia lamblia* in AIDS patients with diarrhea. *J Med Assoc Thai* 1999; 82: 654-659.
- Escobedo AA, Nuñez FA. Prevalence of intestinal parasites in Cuban acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients. *Acta Tropica* 1999; 72: 125-130.
- Joshi M, Chowdhary AS, Dalai PJ, Maniar JK. Parasitic diarrhea in patients with AIDS. *Natl Med J India* 2002; 15: 72-74.
- de Gaetano, Donatti K, Bertagnolio S, Tumbarello M, Tacchelli E, Cataldo M, et al. Effect of highly active antiretroviral therapy on incidence of bacterial pneumonia in HIV-infected subjects. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16: 357-360.