

# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Resistencias genotípicas en pacientes con VIH-1 y grados de viremia persistentemente bajos

Jorge Parra-Ruiz<sup>a</sup>, Marta Álvarez<sup>b</sup>, Natalia Chueca<sup>b</sup>, Alejandro Peña<sup>b</sup>, Juan Pasquau<sup>c</sup>, Miguel Ángel López-Ruz<sup>c</sup>, María del Carmen Maroto<sup>b</sup>, José Hernández-Quero<sup>a</sup> y Federico García<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, España

<sup>b</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, España

<sup>c</sup> Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 16 de noviembre de 2007

Aceptado el 25 de febrero de 2008

On-line el 13 de febrero de 2009

#### Palabras clave:

Carga viral baja persistente

Resistencia genotípica

TARGA

### RESUMEN

**Introducción:** se considera éxito terapéutico cuando un paciente con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) sometido a tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) consigue una carga viral plasmática <50 copias/ml. Sin embargo, es frecuente encontrar a pacientes cuya carga viral se sitúa en 50–1.000 copias/ml, en estos casos las guías de tratamiento no recomiendan realizar un test genotípico de resistencias aduciendo una baja rentabilidad. El objetivo principal de este estudio fue examinar la utilidad de una técnica de concentración para la secuenciación de VIH-1 desde muestras que contienen menos de 1.000 copias/ml, y a partir de aquí determinar las consecuencias virológicas de los cambios guiados por el test de resistencia genotípica del TARGA de estos pacientes.

**Métodos:** se estudió a 51 pacientes con cargas virales de 50–1.000 copias/ml, de los que 27 presentaron estos valores de carga viral durante al menos 12 meses consecutivos. Antes de la extracción del ARN, se concentró una muestra de 3 ml de plasma y, a continuación, se genotipó siguiendo el procedimiento estándar.

**Resultados:** se pudo secuenciar 47 muestras de las 51, con una sensibilidad del 92%. De estos 47 pacientes, 27 mantienen carga viral de 50–1.000 copias/ml durante 12 meses, de ellos, 20 consiguen carga viral indetectable al cambiar el TARGA guiado por el genotipo (análisis por intención de tratar; no consta = fracaso; 20 de 27 [74,1%]) (análisis en tratamiento; 20 de 23 [86,9%]).

**Conclusiones:** mostramos una modificación sencilla de la secuenciación genotípica en pacientes con grados de viremia persistentemente bajos, que resulta en una modificación en el régimen del TARGA que consigue una viremia plasmática indetectable.

© 2007 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Genotypic resistance in HIV-1—infected patients with persistent low-level viremia

### ABSTRACT

#### Keywords:

Persistent low-level viremia

Genotypic resistance

HAART

**Introduction:** Highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV patients is considered successful when plasma viral load (VL) reaches <50 copies/ml. However, many patients have a persistent VL of 50 to 1000 copies/ml, and treatment guidelines do not recommend genotypic resistance testing at these levels because of poor performance. The aim of this study was to evaluate the usefulness of a concentration technique for HIV-1 sequencing in samples with <1000 copies/ml, and determine the virological consequences of HAART treatment changes guided by resistance testing in this scenario.

**Methods:** Observational study performed in 51 patients with plasma VL between 50 and 1000 copies/ml; 27 patients had these levels for at least 12 consecutive months. Prior to RNA extraction, virions were concentrated from 3-ml plasma samples and then genotyped following standard procedures.

**Results:** Forty-seven of the 51 samples were successfully sequenced, resulting in a sensitivity of 92%. Among these 47 patients, 27 showed a persistent viral load of 50–1000 copies/ml for 12 months, and 20 patients achieved undetectable viral load following the genotype-guided HAART change (intention-to-treat analysis: NC = F; 20 of 27 [74.1%]; on-treatment analysis: 20 of 23 [86.9%]).

**Conclusions:** We report a simple method for genotype sequencing in patients with persistent low-level viremia that allowed a modification of the HAART regimen leading to undetectable plasma viremia.

© 2007 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fegarcia@ugr.es (F. García).

## Introducción

De acuerdo con las guías de tratamiento antirretroviral, se considera éxito terapéutico en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a la supresión de la carga viral por debajo de las 50 copias/ml. Sin embargo, la completa erradicación viral no es posible debido a la existencia de reservorios de larga vida, como los linfocitos T CD4+ memoria infectados, que poseen el genoma del VIH integrado.

Una de las principales causas del fracaso del tratamiento antirretroviral (TAR) es la aparición de resistencias a fármacos<sup>1</sup>. Varios estudios han demostrado que los test de resistencia genotípica mejoran la respuesta virológica en pacientes cuyo TAR ha de ser modificado tras el fracaso<sup>2,3</sup>. La evidencia obtenida de estos estudios apoya la recomendación actual del uso del test de resistencia para todos los pacientes que no responden al tratamiento, para los que se plantea un cambio de terapia<sup>4,5</sup>.

Aunque la resistencia a los fármacos antirretrovirales puede desarrollarse con valores bajos de carga viral, las técnicas para su detección no están recomendadas cuando ésta es < 1000 copias/ml por la alta frecuencia de fallo en la secuenciación<sup>6</sup>. Esto complica el correcto mantenimiento clínico de los pacientes con carga viral detectable, pero por debajo de este umbral. Sin embargo, se ha publicado recientemente que es posible detectar mutaciones relacionadas con resistencia a fármacos antirretrovirales de pacientes con carga viral baja<sup>7–10</sup>, aunque la relevancia clínica de estos hallazgos aún no ha sido establecida con claridad.

El objetivo principal de este estudio fue examinar la utilidad de una técnica de concentración para la secuenciación de VIH-1 desde muestras de plasma que contienen menos de 1.000 copias/ml, y a partir de aquí determinar las consecuencias virológicas de los cambios guiados por el test de resistencia genotípica del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) de estos pacientes.

## Pacientes y métodos

Se realizó un estudio observacional con 51 pacientes con VIH-1, del subtipo B, con una carga viral baja, de dos centros que atienden a pacientes con VIH en Granada (Hospital Universitario San Cecilio y Hospital Universitario Virgen de las Nieves), con los siguientes criterios de inclusión: a) infección crónica por VIH-1 documentada; b) TARGA en régimen estable durante al menos 12 meses, y c) dos cargas virales detectables consecutivas pero por debajo de 1.000 copias/ml al mismo tiempo que reciben TARGA. El período de estudio comprendió los años 2002–2005. Para evaluar las consecuencias virológicas de los cambios guiados por el test genotípico, seleccionamos a pacientes con carga viral < 1.000 copias/ml, pero detectable durante un período de, al menos, 12 meses. De este modo, descartamos los casos que desarrollaron un repunte transitorio de carga viral. De los 51 pacientes, sólo 27 cumplían dicho criterio. En estos pacientes, después de ese período, se realizó un cambio de tratamiento y se estudió la repercusión del cambio en la evolución virológica e inmunológica (cambios en carga viral y CD4 a los 3 y 6 meses).

Los análisis para la detección del ARN del VIH-1 se realizaron con el estudio Ultrasensitive de Roche Amplicor Monitor System v1.5 (Roche Diagnostics, Barcelona), cuyo límite inferior de detección es de 50 copias/ml. La técnica de genotipificación se realizó con el sistema TruGene HIV-1 Genotyping Kit (Siemens, Barcelona). Antes de la extracción de ARN, se procedió a la concentración de las muestras de plasma de acuerdo con el siguiente protocolo: las muestras fueron sometidas a tres ciclos de ultracentrifugación en Biofuge Stratos (Heraeus, Barcelona). Una

alícuota inicial de 1 ml de plasma se ultracentrifuga a 23.600 g durante 1 h a 4 °C; se desecha el sobrenadante y otro ml de plasma se añade al *pellet* en el mismo tubo y se repite la centrifugación; después se desecha el sobrenadante, se añade otro ml, y se somete a una tercera centrifugación; finalmente, se desechan 860 µl del sobrenadante y el *pellet* se resuspende intensamente con el remanente de 140 µl, que se somete a la extracción con QUIAMP Viral RNA mini-kit (Qiagen, Barcelona). El eluido de ARN se empleó directamente para el test con Trugene HIV-1 genotyping Kit (Siemens, Barcelona), con las precauciones estándar para evitar contaminaciones cruzadas por PCR. Además, para excluir la contaminación cruzada, todas las secuencias se analizaron con la herramienta *genetic fingerprinting* del *software* de Trugene (Siemens, Barcelona) para explorar las coincidencias entre secuencias de diferentes pacientes. Esta herramienta enfrenta la secuencia de estudio (con una longitud de unos 900 pares de bases) a todas las ya existentes en la base de datos, de modo que diferencias entre secuencias por debajo de 20 pares de bases permiten establecer una elevada homología entre ellas.

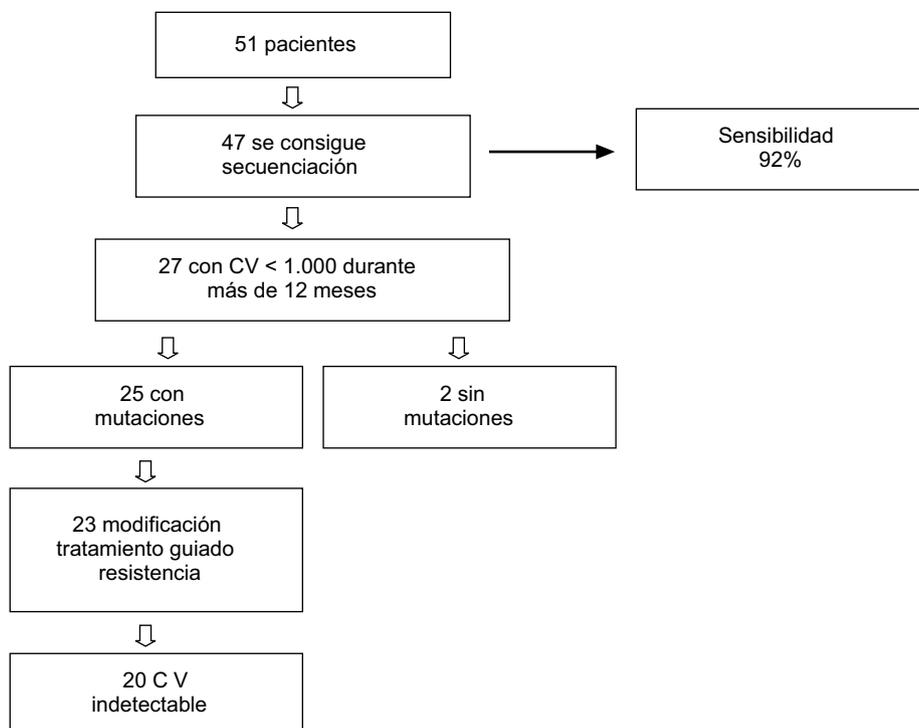
Las secuencias se analizan con TruGene HIV-1 Report Generator, con Guidelines 7.0 (Bayer, Barcelona) y Retrogram v 1.6 ([www.retrogram.com](http://www.retrogram.com)), para conocer las mutaciones de resistencia y su interpretación.

La eficacia del cambio de TARGA guiado por genotipo, definido como la proporción de pacientes que consiguen carga viral indetectable, se midió con un análisis por intención de tratar (ITT; NC = F [no consta = fracaso]) y un análisis en tratamiento (OT).

## Resultados

Para valorar la sensibilidad de nuestro método de concentración, se seleccionó a 51 pacientes con carga viral < 1.000 copias/ml. Se pudo secuenciar 47 de las 51 muestras, con una sensibilidad del 92%. Las cuatro muestras que no se pudo secuenciar tenían una carga viral < 200 copias/ml. De los 51 pacientes incluidos inicialmente, 27 (53%) mantuvieron una carga viral de 50–1.000 copias/ml durante 12 meses, y se seleccionaron para análisis posteriores (fig. 1).

De estos 27 pacientes, la mayoría eran varones (66,7%) con una media de edad de 42 años. La mediana de carga viral basal fue 264 (intervalo, 65–948) copias/ml, y la mediana de recuento de linfocitos CD4 fue 327 (intervalo, 72–844) células/µl. El 48,1% de estos pacientes recibían, al comienzo del estudio, tratamiento con un régimen con análogos de nucleósidos/nucleótidos y no análogos; el 18,5%, con análogos e inhibidores de la proteasa; otro 18,5% recibe tratamiento con los tres grupos antirretrovirales, y el 14,8% restante, sólo con análogos. Las mutaciones de resistencia en el gen de la transcriptasa inversa (RT) y/o proteasa se detectaron en 25 (93%) pacientes. Las mutaciones detectadas en la RT fueron: M41L (48,1%), E44D (22,2%), K65R (7,4%), D67N (55,5%), T69D (7,4%), K70R (22,2%), L74V (7,4%), V118I (18,5%), M184V (48,1%), L210W (37%), T215Y/F (59,2%), K219Q/E (22,2%), A98G (11,1%), L100I (3,7%), K101E/Q (11,1%), K103N (40,7%), V106A (7,4%), V108I (11,1%), Y181C (22,2%), G190A (11,1%), y en la proteasa: L101/V (44,4%), K20M/R (7,4%), D30N (7,4%), M36I (25,9%), M46I/L (33,3%), I54M/V (25,9%), A71V/T (40,7%), V82A (22,2%), I84V (7,4%), N88D/S (11,1%), L90M (29,6%). La genotipificación mostró sensibilidad a algunos de los fármacos antirretrovirales incluidos en el régimen terapéutico que recibían los pacientes en 10 (37%) de los 27 casos, actividad disminuida en 7 (26%) y resistencia a todos los fármacos del régimen en 8 (30%). El patrón de resistencias se muestra en la tabla 1, junto con los regímenes previos, los cambios de tratamiento y la evolución virológica e inmunológica.



**Figura 1.** Distribución de los pacientes. CV: carga viral.

Se realizó una modificación del TARGA en 23 de los 27 pacientes. En 6 el cambio en el tratamiento fue sólo de un fármaco; en 8, de 2 fármacos; en 8, de tres y en un paciente se modificó un régimen con cuatro fármacos por otro con tres distintos. Hubo un paciente que no aceptó la modificación del tratamiento por lo que continuó con el mismo. Para 3 pacientes no había fármacos activos disponibles, por lo que se realizó el cambio de terapia empíricamente, en ninguno de ellos se obtuvo respuesta terapéutica.

En 23 pacientes se realizó la modificación guiada por el genotipo. Después de que el TARGA fuese modificado, los valores de carga viral a los 3 meses fueron indetectables en 19 de 27 (70,4%) pacientes en el análisis ITT, y en 19 de 23 (82,6%) en el análisis OT. A los 6 meses, había 5 pacientes de los que carecíamos del valor de carga viral, por lo tanto, los resultados fueron: 17 de 27 (63%), ITT; 17 de 18 (94,4%), OT. Los resultados que obtenemos, independientemente de si la carga viral indetectable se obtuvo a los 3 o a los 6 meses, cuando analizamos el porcentaje de pacientes que logra la indetectabilidad, fueron 20 de 27 (74,1%) pacientes en el análisis ITT, y 20 de 23 (86,9%) en el análisis OT. Los hallazgos inmunológicos de los pacientes en que fue posible la modificación guiada por el genotipo fueron como sigue: mediana de recuento de linfocitos CD4 basal de 327 (intervalo, 72–823) células/ $\mu$ l; en el tercer mes, 356 (intervalo, 62–882), y a los 6 meses, 386 (intervalo, 120–797). Estos cambios no fueron significativos.

## Discusión

Los pacientes con cargas virales plasmáticas de 51–1.000 copias/ml durante al menos 3 meses se consideran con viremias persistentemente bajas. Diferente es el concepto de *blips*, que define los casos con repuntes de carga viral de 50–1.000 copias/ml, precedida y seguida por otra medida  $< 50$  copias/s/ml. Los repuntes transitorios de carga viral durante el TARGA pueden observarse en hasta el 25–53% de los pacientes<sup>11,12</sup>. Se ha descrito

la relación entre los pacientes con carga viral persistentemente baja y una mayor probabilidad de fracaso virológico. Los virus plasmáticos que causan estos episodios durante el TARGA parecen originarse desde dos procesos distintos: a) producción de partículas virales a partir de células de larga vida infectadas de meses a años antes del inicio del TARGA, y b) a partir de una escasa replicación con selección de nuevas mutantes<sup>13</sup>. Tobin et al<sup>13</sup> demuestran que las secuencias de los virus plasmáticos y las secuencias procedentes de las células memoria (polimorfonucleares) son las mismas. Por lo tanto, estos episodios transitorios de viremia se relacionan con un incremento de la replicación de virus competente en reservorios celulares, este *pool* de virus que se replica potencia la falta de respuesta del fármaco mediante mutaciones que permiten incrementar el *fitness* y la resistencia al fármaco. Si se han seleccionado virus resistentes con una terapia no supresiva anterior, habrá producción continua de estos virus resistentes, aunque el paciente haya modificado su tratamiento. Identificar estas mutaciones puede ser útil en la elección de fármacos antirretrovirales<sup>14–16</sup>. Sin embargo, también se ha descrito que la producción de escasos virus puede ocurrir durante varios años sin seleccionar mutaciones de resistencia a ninguno de los fármacos del régimen<sup>16</sup>.

Por razones técnicas, los sistemas genotípicos comerciales no se recomiendan para pacientes que tengan resistencia terapéutica, pero que tienen una carga viral  $< 1.000$  copias/s/ml<sup>6</sup>. Estas recomendaciones se basan en el hecho de que el éxito de las técnicas con muestras con carga viral baja es pequeño y sobre la creencia de que la amplificación de muestras con carga viral baja podría permitir seleccionar cepas no representativas motivando cambios prematuros en el tratamiento antirretroviral. Esta última razón, sin embargo, nunca ha sido apoyada por datos científicos<sup>17</sup>. Por contraste, las actuales guías de tratamiento indican que el TARGA debería cambiarse después de dos cargas virales consecutivas de VIH  $> 400$  copias/s/ml; la razón para este cambio es intentar reducir la posibilidad de desarrollo de resistencias farmacológicas al régimen que fracasa. Una publicación de la cohorte de EuroSIDA de Cozzi-Lepri<sup>18</sup> ha demostrado que en el 77% de los pacientes con

**Tabla 1**  
TARGA, mutaciones de resistencia, interpretación de la resistencia y modificaciones al TARGA de la cohorte estudiada

N.º paciente	TARGA anterior <sup>a</sup>	TARGA actual <sup>b</sup>	CV basal	Mutaciones en la proteasa	Mutaciones en la RT	Nuevo TARGA <sup>c</sup>	CV (copias/s/ml), 3 o 6 meses
1	AZT, ddl, IDV-r	AZT, 3TC, NVP	467	Cepa salvaje <sup>d</sup>	M41L, M184V, T215Y, K103N	ddl, d4T, LPV-r	<50/<50
2	AZT, ddl, ddC, 3TC, d4T, IDV, NFV	3TC, d4T, NVP	690	L10V, M46I, A71V, L90M	M41L, E44D, V118I, M184V, L210W, T215Y, K103N	ddl, TDF, LPV-r	<50/<50
3	AZT, 3TC, NFV	ddl, d4T, EFV	577	M36I, I54V, L90M	D67N, K70R, K219E, A98G, K103N	ddl, TDF, LPV-r	<50/<50
4	AZT, ddl, 3TC, NVP, EFV	AZT, 3TC, NVP	451	L10I	D67N, M184V, K103N	AZT, TDF, NFV	<50/<50
5	ddl, ddC, d4T, EFV, IDV-r, SQV-r, NFV	ABC, AZT, 3TC	166	L10I, M36I, A71V, L90M	M41L, D67N, M184V, L210W, T215F, A98G	NVP, TDF, ABC	183/1.020
6	AZT, ddl, 3TC, d4T, ABC, IDV-r	ABC, 3TC, d4T	348	L10I, V32I, M46L, A71V, V82A	M41L, E44D, D67N, V118I, M184V, L210W, T215Y	NVP, ABC, TDF	4.050/79
7	AZT, ddl, ddC, 3TC, d4T, NVP, IDV, NFV	3TC, d4T, NVP, NFV	700	L10I, M46L, I54V, A71V, V82A, L90M	M41L, E44D, D67N, T69D, M184V, L210W, T215Y, K219E	ddi, TDF, APV-r	685/< 50
8	NA	ABC, ddl, d4T	738	L10I, K20M, M36I, I54V, A71V, V82A, L90M	M41L, E44D, D67N, V118I, L210W, T215Y, Y181C	ABC, ddl, TDF	1.170/1.560
9	AZT, ddC, IDV-r	ddl, d4T, NFV	300	D30N, M36I, A71T, N88D	M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y, K219E	3TC, ABC, TDF	279/< 50
10	AZT, 3TC, NFV	AZT, 3TC, NFV	192	Cepa salvaje	Cepa salvaje	AZT, 3TC, LPV-r	<50/<50
11	NA	AZT, 3TC, EFV	342	M36I	D67N, K70R, M184V, K219E, V108I	APV-r, ABC, TDF	<50/<50
12	AZT, ddl, 3TC, d4T, EFV, IDV, NFV	ABC, d4T, EFV	264	V32I, M46I, A71V, V82A	D67N, K70R, K101Q, K103N, V108I	d4T, TDF, LPV-r	<50/169
13	AZT, ddl, ddC, 3TC, d4T, NVP, IDV-r, NFV, LPV-r	ddl, d4T, TDF, LPV-r	200	L10I, K20R, M46I, I54M/V, A71V, I84V, L90M	M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y, K219E	ddl, TDF, EFV	938/NA
14	IDV	3TC, d4T, EFV	65	Cepa salvaje	M184V, L100I, K103N	ddl, d4T, LPV-r	<50/NA
15	AZT, ddl, ddC, 3TC, d4T, ABC, TDF, EFV, SQV, NFV	ddl, TDF, EFV	116	D30N, M36I, M46L, N88D	K65R, T215F, K103N, V108I, V181C	ddl, LPV, TDF	<50/<50
16	AZT, ddC, IDV	ddl, d4T, NVP	196	L10V, D30N, M46I	K65R, V181C, G190A	D4T, ABC, LPV-r	<50/<50
17	AZT	ddl 3TC, NVP	400	Cepa salvaje	L74V, M184V, A98S, Y181C, G190A	TDF, d4T, LPV-r	<50/<50
18	NA	ddl, TDF, EFV	173	I54V, V82A	M41L, E44D, D67N, V118I, L210W, T215Y, K219E, K103N, G190A	ddl, TDF, LPV-r	<50/<50
19	NA	3TC, d4T, NVP	275	Cepa salvaje	M184V, T215Y, K101E, V106A	EFV, ddl, TDF	<50/<50
20	NA	TDF, LPV-r	144	M46L, I54V, A71T, L90M	M41L, D67N, L210W, T215Y, A98G	3TC, TDF, ddl	11.000/60
21	AZT, 3TC, NVP, IDV, NFV	ddl, d4T, NFV, NVP	385	L10I, N88S	D67N, K70R, K219E, V181C	ddl, d4T, LPV-r	<50/<50
22	AZT, ddl, 3TC, d4T, NVP, EFV, IDV	AZT, 3TC, ABC	230	Cepa salvaje	M41L, M184V, T215F, K103N	ddl, TDF, LPV-r	<50/<50
23	NA	ddl, EFV, LPV-r	154	Cepa salvaje	Cepa salvaje	TDF, ddl, LPV-r	164/< 50
24	NA	TDF, EFV, LPV-r	156	M46I, A71T, I84V	M41L, E44D, D67N, L210W, T215F	TDF, EFV, LPV-r	279/NA
25	AZT, 3TC, IDV	AZT, 3TC, LPV-r	948	Cepa salvaje	M184V	AZT, ddl, LPV-r	<50/NA
26	IDV	d4T, EFV, LPV-r	152	L10I, V82A	D67N, T69D, T215F	TDF, EFV, LPV-r	<50/NA
27	AZT, ddl, ddC, 3TC, d4T, NVP, SQV, NFV	ABC, ddl, NVP	156	L10V, M36I, A71V, L90M	M41L, L74V, V118I, M184V, T215Y, V106N	d4T, TDF, LPV-r	<50/<50

3TC: lamivudina; ABC: abacavir; AZT: zidovudina; CV: carga viral; d4T: estavudina; ddC: zalcitabina; ddl: didanosina; EFV: efavirenz; IDV: indinavir; NA: no disponible; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapina; RT: transcriptasa inversa; SQV: saquinavir; TARGA: tratamiento antirretroviral de gran actividad; TDF: tenofovir.

<sup>a</sup> TARGA antes de comenzar el estudio.

<sup>b</sup> TARGA en el momento de comenzar el estudio.

<sup>c</sup> Nuevo TARGA tras el test de resistencia.

<sup>d</sup> Cepa salvaje es ausencia de mutaciones.

carga viral baja y con un régimen estable que no responde aparece al menos una nueva mutación de resistencia en un segundo genotipo. Estos datos son similares a los de la cohorte Scope<sup>19</sup> y, por lo tanto, el retraso hasta conseguir una carga viral suficientemente alta puede resultar en una evolución adicional del patrón de resistencias<sup>7</sup>, especialmente en los pacientes que han recibido más de dos o tres líneas de tratamiento<sup>20</sup>. Gunthard et al<sup>15</sup> demuestran que las resistencias pueden desarrollarse cuando la viremia está en el intervalo de 20–400. Si bien, Napravnik et al<sup>21</sup> afirman que hay una mayor probabilidad de desarrollar resistencia con carga viral entre 3 y 4 logaritmos. La importancia de la detección de resistencias a un fármaco en pacientes con viremia baja es crucial, ya que un cambio terapéutico oportuno podría evitar continuar con un régimen que no responde cuando la resistencia es todavía limitada y un cambio puede ayudar a preservar futuras opciones de tratamiento y evitar resistencias cruzadas, además de prevenir el desarrollo de toxicidades. Por lo tanto, es obvia la necesidad de genotipificación con carga viral baja. Algunos autores<sup>7,8</sup> han publicado que es técnicamente factible realizar la secuenciación de muestras con carga viral baja, pero la relevancia clínica de estos hallazgos todavía es controvertida. Recientemente, Gale et al<sup>9</sup> han presentado datos de cómo diluyendo 20 muestras para conseguir cargas virales <1.000 copias/s/ml (100 a 500 copias/s/ml) logran genotipificarlas con éxito usando TruGene Bayer Assay y con un paso previo de centrifugación. Waters et al<sup>10</sup>, mediante el secuenciador ABI 3730XL, obtienen una amplificación que varía del 70 al 92%, según el valor de la carga viral de partida, que varía de 50 a 1.000 copias/s/ml.

Nuestro trabajo aporta un método fácil para concentrar viriones de muestras de plasma, con una sensibilidad excelente para pacientes con carga viral <1.000 copias/s/ml. La única modificación a las recomendaciones del protocolo del fabricante es una ultracentrifugación de las muestras y el empleo de un mayor volumen de muestra. En nuestro caso, lo hacemos en tres pasos, pero si se dispone de una ultracentrífuga que permita el empleo de volúmenes mayores, entonces se podrá realizar en un único paso. En contraste con otros estudios<sup>8</sup>, no clonamos el producto de la PCR, ya que la población secuenciada podría reflejar mejor el trabajo de rutina que la clonación. La población que estudiamos mostraba una gran prevalencia de mutaciones de resistencia (93%), probablemente porque estaba compuesta principalmente por pacientes con amplia experiencia antirretroviral, el 70% de los pacientes no había respondido a dos o más regímenes antirretrovirales.

La carga viral persistentemente baja puede ser una condición peculiar en la cual su supresión se obtiene más fácilmente, incluso con la adición secuencial de un único fármaco, como han demostrado algunos estudios de intensificación<sup>22</sup>. Sin embargo, actualmente no está claro que la sustitución puntual del fármaco, o fármacos, para los cuales hay resistencia pueda impedir una nueva evolución del VIH-1, que permita el desarrollo de resistencias cruzadas, e interfiera en futuras opciones terapéuticas. En este contexto, como en nuestros pacientes, incluso con carga viral baja, los ensayos de resistencia son útiles para conseguir carga viral indetectable después de un cambio de TARGA guiado por el genotipo (el 78%, carga viral <50 copias/s/ml a los 3 y 6 meses en el análisis ITT). Además, consideramos que, aunque es posible, no es probable que encontremos un resultado falso negativo (ausencia de mutaciones) después de genotipificar la muestra con carga viral baja, ya que, con la modificación que describimos aquí, incrementamos la sensibilidad de los métodos de genotipificación; de hecho, se pudo genotipificar 47/51 muestras con carga viral <1 000 copias/s/ml y sólo 2/27 pacientes con bajo grado de viremia persistente tienen virus *wild-type*. En 14 de los 27 pacientes disponíamos de estudios genotípicos previos o

posteriores cuando su carga viral fue > 1.000 copias/s/ml, en éstos la herramienta *genetic fingerprinting* da coincidencias entre las distintas cepas del mismo paciente. Esta herramienta enfrenta la secuencia de estudio (con una longitud de unos 900 pares de bases) a todas las ya existentes en la base de datos, de modo que diferencias entre secuencias por debajo de 20 pares de bases permiten establecer una elevada homología entre ellas. En nuestro estudio, en los 14 casos en los que disponíamos de secuencias previas o posteriores, las diferencias entre secuencias nunca superaron el valor de 20 para las que pertenecían a un mismo paciente, lo que se puede interpretar como garantía de que las secuencias obtenidas con ese valor de baja carga viral son correctas. Además, distintos autores ya han demostrado que no hay diferencias entre las mutaciones detectadas cuando se amplifican y secuencian virus de muestras de un mismo paciente diluidas por debajo de 1.000 copias/s/ml<sup>7,23</sup>.

En resumen, un grado de viremia bajo pero detectable mientras se recibe TARGA es suficiente para generar virus con mutaciones de resistencia, lo que permite que la replicación hasta cargas virales que alcancen más de 1.000 copias/s/ml puede resultar en una evolución adicional del patrón de resistencias. La realización del test de resistencia con cargas virales bajas es posible empleando un método de ultracentrifugación para concentrar el virus y un mayor volumen de muestra de partida, y en nuestro estudio la posterior modificación del TARGA guiada por el genotipo conllevó una buena respuesta virológica después de 3 o 6 meses. Nuestros resultados, junto con otros<sup>7,8</sup>, sientan las bases para investigaciones futuras para establecer la recomendación de realizar estudios de resistencia a fármacos en pacientes con carga viral persistentemente baja.

## Financiación

Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (CTS213; PO6-CTS-01498), Consejería de Salud, Junta de Andalucía (377/05; PI-0129; PI/0408/08) y Fondo de Investigación Sanitaria (PI051513, ISCIII-RETIC RD06/00006/0016).

## Bibliografía

- DeGruttola V, Dix L, D'Aquila R, Holder D, Phillips A, Ait-Khaled M, et al. The relation between baseline HIV drug resistance and response to antiretroviral therapy: re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan. *Antivir Ther*. 2000;5:41–8.
- Harrigan PR, Côté H. Clinical utility of testing human immunodeficiency virus for drug resistance. *Clin Infect Dis*. 2000;30(Suppl 2):S117–22.
- Cingolani A, Antinori A, Rizzo MG, Murri R, Ammassari A, Baldini F, et al. Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: a randomized study (ARGENTA). *AIDS*. 2002;16:369–79.
- Vandamme AM, Houyez F, Banhegyi D, Clotet B, De Schrijver G, De Smet KA, et al. Laboratory guidelines for the practical use of HIV drug resistance tests in patient follow-up. *Antivir Ther*. 2001;6:21–39.
- Panel de expertos de GESIDA. Plan Nacional sobre el Sida. Recomendaciones de GESIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana [citado Ene 2008]. Disponible en: <http://www.gesida.seimc.org>.
- Department of Health and Human Services (DHHS). Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents [citado 25 Ene 2006]. Disponible en: <http://www.aidsinfo.nih.gov>.
- Mackie N, Dustan S, McClure MO, Weber JN, Clarke JR. Detection on HIV-1 antiretroviral resistance from patients with persistently low but detectable viremia. *J Virol Methods*. 2004;119:73–8.
- Nettles RE, Kieffer TL, Simmons RP, Cofrancesco Jr. J, Moore RD, Gallant JE, et al. Genotypic resistance in HIV-1-infected patients with persistently detectable low-level viremia while receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2004;39:1030–7.
- Gale HB, Kan VL, Shinol RC. Performance of the TruGene Human Immunodeficiency Virus Type 1 genotyping kit and OpenGene DNA sequencing system on clinical samples diluted to approximately 100 copies per milliliter. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:235–8.

10. Waters L, Mandalia S, Asboe D. Successful use of genotypic resistance testing in HIV-1-infected individuals with detectable viraemia between 50 and 1000 copies/ml. *AIDS.* 2006;20:778–9.
11. Havlir DV, Bassett R, Levitan D, Gilbert P, Tebas P, Collier AC, et al. Prevalence and predictive value of intermittent viremia with combination hiv therapy. *JAMA.* 2001;286:171–9.
12. Sungkanuparph S, Groger RK, Overton ET, Fraser VJ, Powderly WG. Persistent low-level viraemia and virological failure in HIV-1 infected patients treated with Highly Active Antiretroviral Therapy. *HIV Med.* 2006;7:437–41.
13. Tobin NH, Learn GH, Holte SE, Wang Y, Melvin AJ, McKernan JL, et al. Evidence that low-level viremias during effective Highly Active Antiretroviral Therapy result from two processes: expression of archival virus and replication of virus. *J Virol.* 2005;79:9625–34.
14. Lloyd RM, Schuurman R, Stang HL, De Groot T, Hough LM, Burns DA, et al. Accuracy and reproductibility of ultra low-copy HIV viral genotyping. *Qiagen news [revista electrónica].* 2000 [citado 17 Oct 2006]. Disponible en: <http://www.qiagen.com>.
15. Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Guatelli JC, Riggs NL, Havlir DV, et al. Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy. *J Virol.* 1998;72:2422–8.
16. Hermankova M, Ray SC, Ruff C, Powell-Davis M, Ingersoll R, D'Aquila RT, et al. HIV-1 drug resistance profiles in children and adults with viral load of <50 copies/ml receiving combination therapy. *JAMA.* 2001;286:196–207.
17. Steegen K, Demecheleer E, De Cabooter N, Nges D, Temmerman M, Ndumbe P, et al. A sensitive in-house RT-PCR genotyping system for combined detection of plasma HIV-1 and assessment of drug resistance. *J Virol Methods.* 2006;133:137–45.
18. Cozzi-Lepri A, Phillips AN, Ruiz L, Clotet B, Loveday C, Kjaer J, et al. Evolution of drug resistance in HIV infected patients remaining on a virologically failing HAART regimen. En: Program and abstract of the 10th European AIDS Conference (EACS), 2005; Dublin, Ireland. Abstract PE17.4/2.
19. Hatano H, Hunt P, Weidler J, Coakley E, Hoh R, Liegler T, et al. Rate of viral evolution and risk of losing future drug options in heavily pretreated, HIV-infected patients who continue to receive a stable, partially suppressive treatment regimen. *CID.* 2006;43:1329–36.
20. Aleman S, Söderbärg K, Visco-Comandini U, Sitbon G, Sönnnerborg A. Drug resistance at low viremia in HIV-1 infected patients with antiretroviral combination therapy. *AIDS.* 2002;16:1039–44.
21. Napravnik S, Edwards D, Steward P, Stalzer B, Matteson E, Eron JJ. HIV-1 drug resistance evolution among patients on potent combination antiretroviral therapy with detectable viremia. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;40:34–40.
22. Blanco JL, Biglia MA, Arnedo M, Martinez E, Mallolas J, Milinkovic A, et al. Evolution of resistance mutations pattern in HIV-1-infected patients during intensification therapy with a boosted protease inhibitor. *AIDS.* 2005;19:829–31.
23. Stone C, Holbrook J, Madsen H, Modha S, Craig C. Amplification and sequencing of HIV-1 from low viral load plasma samples and analysis and interpretation of sequences obtained. En: Program and abstract of the 4th European HIV Drug Resistance Workshop; March 29-31, 2006; Monte Carlo, Mónaco. Abstract 63.