



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



## Evaluación crítica de los nuevos métodos comerciales para la determinación de la carga viral del VIH-1 y del VHC

Antonio Aguilera<sup>a,\*</sup>, Jose María González Alba<sup>b,c</sup>, Lucía Martínez Lamas<sup>a</sup>, María Luz Moldes Suárez<sup>a</sup> y Juan Carlos Galán<sup>b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, España

<sup>b</sup>Unidad de Virología Molecular, Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España

<sup>c</sup>Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España

<sup>d</sup>CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, España

### Palabras clave:

Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

Hepatitis C

Carga viral

### RESUMEN

Las técnicas de cuantificación viral tienen cada vez más demanda en la microbiología clínica, bien para la evolución de pacientes trasplantados, bien para el seguimiento a largo plazo de enfermedades crónicas como los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y de la hepatitis C (VHC). Las diferentes compañías farmacéuticas, interesadas en el desarrollo de metodologías eficientes y precisas para el diagnóstico y la correcta cuantificación viral han convergido en los últimos 2 años en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real aplicada a la cuantificación del VIH y del VHC, para incrementar la sensibilidad, la precisión, la linealidad y la correcta detección de la diversidad genómica de estos dos virus respecto a las técnicas clásicas que se venían aplicando desde finales de la década de 1990. La PCR en tiempo real es la gran herramienta del futuro inmediato, por su sensibilidad y precisión; sin embargo, se debe dar respuesta a nuevas preguntas, como si la constante variabilidad genética en ambos virus puede afectar progresivamente a la correcta cuantificación viral, situación difícilmente detectable al existir una uniformidad metodológica.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### A review on new commercial methods for HIV-1 and HCV viral load determinations

### ABSTRACT

Viral load techniques are more and more demanded in Clinical Microbiology, regarding with transplanted patients or long time follow-up of chronic diseases as those caused by human immunodeficiency (HIV) and hepatitis C (HCV) viruses. In the last 2 years, pharmaceutical companies, interested to develop more efficient and accurate methods for the diagnosis and correct viral quantification of HIV and HCV, have converged in the real time-polymerase chain reaction (PCR) technique. This process is due to the increased sensitivity, accuracy, linearity and correct detection of genomic viral variants of real time PCR techniques, in comparison with classical molecular methods applied since the nineties of the past century. In spite real time PCR appears as the best tool for the immediate future, new questions regarding the high variability of these viruses should be considered. This could affect the correctness of viral quantifications, while being difficult to detect it because of the methodological uniformity in the clinical laboratories.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Keywords:

Human immunodeficiency virus type 1

Hepatitis C

Viral load

\* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: antonio.aguilera.guirao@sergas.es (A. Aguilera) / jgalanm.hrc@salud.madrid.org (J.C. Galán).

## Introducción

La utilización, por parte del laboratorio de microbiología, de marcadores moleculares que permiten cuantificar la carga vírica, como en caso de los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) o de la hepatitis C (VHC), es esencial para el manejo de los pacientes infectados por virus, al ser indicadores directos de un proceso de replicación viral activa. La determinación de la carga vírica de estos agentes infecciosos constituye la mayor carga de trabajo en cualquier unidad de virología molecular.

Poco después de establecerse que las células diana del virus VIH eran los CD<sub>4+</sub>, éstos se convirtieron en el mejor marcador pronóstico de la progresión al sida<sup>1</sup>. Sin embargo, los investigadores en VIH buscaban un marcador que permitiera predecir la progresión de la enfermedad antes que se produjera una grave destrucción del sistema inmune. Fue a mediados de la década de 1990, gracias a los trabajos de la cohorte MACS publicados por el grupo de Pittsburg, Baltimore y Los Ángeles, cuando se demostró que una elevada carga viral del VIH-1 estaba asociada con una rápida progresión de la enfermedad<sup>2,3</sup>. Desde entonces, una multitud de publicaciones y revisiones científicas han hecho hincapié en la necesidad de determinar de manera simultánea los niveles de carga viral del VIH-1 y el recuento de células CD<sub>4+</sub>, como el procedimiento más completo para el seguimiento longitudinal de estos pacientes<sup>4-6</sup>; se trata del procedimiento recomendado por todas las sociedades científicas relacionadas con el estudio de esta enfermedad<sup>7-9</sup>. Los múltiples protocolos nacionales e internacionales recomiendan realizar la cuantificación viral del VIH-1 en cuatro casos: a) como valor basal, antes de iniciar un tratamiento antirretroviral; b) para estimar la eficacia de un tratamiento antirretroviral, o cuando se cambie éste por efectos secundarios o haya sospecha de fracaso; c) en el seguimiento de individuos seropositivos para el VIH-1 tratados y no tratados con antirretrovirales, y d) si bien esta metodología no está aprobada con fines diagnósticos, sí se puede emplear para casos excepcionales como recién nacidos de madres seropositivas.

## Métodos comerciales de cuantificación del VIH-1

Desde que se estableció la trascendencia de estos biomarcadores como factores predictivos, las nuevas tecnologías de biología molecular fueron adecuándose para este propósito. Básicamente, se describieron dos metodologías, basadas bien en la amplificación de ácidos nucleicos o amplificaciones de señal (tabla 1). La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada por Mullis et al<sup>10</sup>, fue la primera plataforma aprobada para la cuantificación del VIH-1 en 1996 y comercializada por la empresa Roche Molecular Systems con el nombre Amplicor HIV-1 monitor<sup>11</sup>. Cinco años después, una metodología similar, aunque algo más compleja (requería tres enzimas y cuatro sondas), comercializada por la empresa Abbott Molecular como LCx HIV-1 (reacción en cadena de la ligasa)<sup>12</sup>, fue aprobada para su uso clínico solamente en Europa<sup>13</sup>. En ese mismo año también se aprobó la tecnología NASBA (amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos)<sup>14</sup>, comercializada por la empresa BioMérieux con el nombre de Nuclisens® VIH-1 QT<sup>15</sup>. Finalmente, en 2002, se acepta la única tecnología de amplificación de señal, bDNA (branched DNA)<sup>16</sup>, comercializada por Siemens Healthcare Diagnostics como Versant® HIV-1 RNA 3.0<sup>17</sup>.

El ensayo ideal para cuantificar la carga vírica del VIH debería responder a una alta sensibilidad analítica (el nivel más bajo de detección viral), a una reproducibilidad y una linealidad elevadas, así como a una correcta cuantificación de todos los tipos y subtipos del virus. A estas características técnicas hay que añadir la carga máxima de trabajo del ensayo, la automatización del procedimiento, la reducción en el riesgo de contaminaciones cruzadas y el menor tiempo en la obtención de resultados. Ninguno de los ensayos descritos cumplía la condición de ensayo ideal. Mientras que bDNA mostraba

los mejores resultados de reproducibilidad y precisión a cargas virales bajas<sup>18,19</sup>, la falta de automatización condicionaba la rápida obtención de resultados. Esta misma limitación ocurría con LCx de Abbott Molecular, que, pese a ser la única plataforma capaz de cuantificar VIH-1 grupo O, sólo podía procesar 24 muestras simultáneamente. Esta limitación fue atendida por la empresa Roche, que rápidamente dispuso de una versión con extracción automática del ARN, denominada Cobas Ampliprep®/Cobas Amplicor® HIV-1 que podía procesar 48 muestras en 7 h. Sin embargo, esta plataforma era incapaz de detectar VIH-1 grupo O y se comunicaban problemas en la correcta cuantificación viral de algunos subtipos virales. Posiblemente, Nuclisens® VIH-1 QT era la plataforma en la que se describían mayores dificultades para cuantificar correctamente la diversidad de tipos y subtipos de VIH-1. Así, además de no cuantificar los grupos N y O, subcuantificaba los subtipos H, G y F<sup>20</sup>, lo que motivó que no se recomendase su uso en países como Brasil, con altas tasas de infecciones por VIH-1 subtipo F<sup>21</sup>.

Todas estas desventajas se han ido convirtiendo en serios problemas para el manejo longitudinal de estos pacientes: a) por el mayor seguimiento de los pacientes después de iniciar los tratamientos antirretrovirales, hasta obtener una carga viral indetectable; b) debido a que la duración de la respuesta virológica es mayor cuanto más rápidamente se alcance el valor de carga viral indetectable<sup>22</sup>, ya que, aparentemente, no se desarrolla resistencia cuando la carga viral es < 50 copias/ml<sup>23</sup>, aunque sí cuando la carga es < 400 copias/ml<sup>24</sup>, y c) por la mayor frecuencia en nuestro entorno de subtipos no-B<sup>25,26</sup>. Este cambio epidemiológico tiene una gran importancia en el diagnóstico, pues todas las plataformas descritas se estandarizaron usando como referencia el subtipo B, que es mayoritario en los países industrializados. Este nuevo escenario ha condicionado la necesidad de disponer de plataformas automatizadas con mayor capacidad de trabajo, con un mayor grado de sensibilidad ( $\leq 50$  copias/ml) y contrastadas para detectar y cuantificar adecuadamente la gran diversidad de subtipos y formas recombinantes que se detectan en nuestro entorno.

Por estos motivos, prácticamente todas estas metodologías han sido o están siendo reemplazadas por una nueva generación metodológica, la PCR en tiempo real, que aporta un mayor intervalo de cuantificación, una mayor sensibilidad, una mayor rapidez en la obtención de los resultados y unos riesgos de contaminación menores<sup>27</sup>. A este avance metodológico hay que añadir la disposición de sistemas de extracción automática en todas las opciones (v. tabla 1), reduciendo sensiblemente el riesgo de contaminación cruzada o de errores humanos. Nuevamente, Roche Molecular Systems fue la primera empresa en disponer de una plataforma basada en PCR en tiempo real, aprobada para la cuantificación del VIH en 2007 (COBAS Ampliprep® TaqMan HIV-1)<sup>28</sup>, aunque en el mismo año Abbott Molecular dispuso de un producto similar aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) y la Comisión Europea (CE), conocido como Abbott RealTime<sup>®29</sup>. En 2008, un producto similar, conocido como Versant® kPCR Molecular Systems fue aprobado por la UE y comercializado por la empresa Siemens Healthcare Diagnostics<sup>30</sup>. Por último, la empresa BioMérieux ha obtenido, en 2009, la marca CE para poder realizar ensayos de cuantificación viral en muestras de sangre seca (Nuclisens® EasyQ HIV-1 v2.0), lo que permite analizar las muestras en sitios muy alejados del lugar donde se obtienen<sup>31</sup>. Las características técnicas de estas nuevas plataformas se describen en la tabla 1.

### *Evaluación crítica de los sistemas comerciales disponibles para la determinación de la carga viral del VIH-1: la necesidad del control de calidad externo*

Existe una extensa bibliografía sobre las características de linealidad, sensibilidad o precisión de cada una de estas nuevas plataformas descritas. También han sido extensamente documentadas las correla-

**Tabla 1**  
Algunas características de las diferentes plataformas comercializadas para la cuantificación viral del VIH-1

Ensayo	Firma comercial	Fecha de comercialización	Volumen requerido	Método de amplificación	Rango dinámico	Diana de detección	Extracción automática	Detección VIH-1 grupo O
<i>Primera generación</i>								
Cobas Amplicor HIV-1 Monitor	Roche	1996 (convencional)	200 µl	PCR-TR	400-7,5 × 10 <sup>5</sup>	<i>gag</i>	Sí	No
		1999 (ultrasensible)	500 µl	PCR-TR	50-1 × 10 <sup>5</sup>	<i>gag</i>	Sí	No
Nuclisens® HIV-1 QT	BioMérieux	2001	1.000 µl	NASBA	176-3,4 × 10 <sup>6</sup>	<i>gag</i>	Sí	No
LCx HIV-1	Abbott	2001 <sup>a</sup>	1.000 µl	PCR-TR	50-1 × 10 <sup>6</sup>	<i>pol</i> (integrasa)	No	Sí
Versant® HIV-1 RNA 3.0	Siemens	2002	1.000 µl	bDNA	50-5 × 10 <sup>5</sup>	<i>pol</i>	No	No
<i>Segunda generación</i>								
Cobas Ampliprep® TaqMan HIV-1 v2.0	Roche	2008 <sup>b</sup>	1.000 µl <sup>b</sup>	PCR tiempo real	20-1 × 10 <sup>7</sup>	<i>gag</i> y LTR	Sí	Sí
RealTime® HIV-1	Abbott	2007	1.000 µl <sup>c</sup>	PCR tiempo real	40-1,1 × 10 <sup>7</sup>	<i>pol</i> (integrasa)	Sí	Sí
Versant® HIV-1 RNA 1.0 (kPCR)	Siemens	2008 <sup>a</sup>	750 µl	PCR tiempo real	35-1,1 × 10 <sup>7</sup>	<i>pol</i> (integrasa)	Sí	Sí
Nuclisens® EasyQ HIV-1 v1.2 <sup>d</sup>	BioMérieux	2009 <sup>a</sup>	1.000 µl	PCR tiempo real	24-1 × 10 <sup>6</sup>	<i>gag</i>	Sí	No

<sup>a</sup>No aprobados por la FDA.

<sup>b</sup>850 µl sin volumen muerto.

<sup>c</sup>Similares resultados obtenidos con 600 µl.

<sup>d</sup>No aprobado por la FDA. Existe una versión previa aprobada en 2007 por la FDA con un límite de detección de 40 copias/ml. Recientemente, una nueva versión 2.0 ha obtenido la marca CE como única plataforma para la cuantificación viral en muestras de sangre seca.

ciones que existen entre ellas (tabla 2). En general, podemos concluir que, actualmente, el coeficiente de correlación entre ellas es excelente, aunque esta generalización no es aplicable cuando se comparan metodologías de lo que hemos venido a llamar plataformas de primera generación, con valores de coeficientes de correlación ( $r \leq 0,91$ ), como la modesta correlación ( $r = 0,79$ ) entre LCx de Abbott Molecular y Nuclisens® VIH-1 QT de BioMérieux<sup>12</sup>. Estas discrepancias han permitido justificar, durante mucho tiempo, la inconveniencia de cambiar frecuentemente de metodología para detectar la carga viral del VIH-1. Sin embargo, las plataformas de la segunda generación tienen muy buena correlación cuando se comparan con las de la primera, tanto de su misma metodología como de metodologías diferentes (v. tabla 2). Existen multitud de publicaciones en este sentido, con unos coeficientes de correlación que oscilan entre 0,94 y 0,97. Se ha comunicado una excepción entre RealTime® de Abbott y NucliSens® EasyQ HIV-1 v1.1 de BioMérieux, recientemente<sup>32</sup> con  $r = 0,91$ , con diferencias entre el subtipo B y los subtipos no-B, donde el valor de  $r$  es 0,97. Desgraciadamente, hasta la fecha sólo tenemos una comparación entre plataformas de segunda generación: COBAS Ampliprep® TaqMan de Roche y RealTime® de Abbott, con un resultado de  $r = 0,94$ <sup>33</sup>. Si las comparaciones pendientes entre estas plataformas muestran tan excelentes correlaciones como se han descrito hasta ahora, la inconveniencia de cambiar de plataforma estaría menos justificada.

En general, las metodologías de segunda generación son más sensibles para detectar el virus<sup>34</sup>. Sin embargo, una cuestión fundamental es el interés por las diferentes empresas comerciales en rebajar el límite de detección inferior de sus metodologías, desde las 50 copias/ml de muchas plataformas de primera generación a las 40 copias/ml en RealTime® de Abbott, o 37 copias/ml de Versant® kPCR de Siemens, o las 20 copias/ml de Cobas Ampliprep® TaqMan HIV-1 v2.0. Sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado si este descenso tiene alguna significación clínica, es decir, ¿puede desarrollarse resistencia a fármacos antirretrovirales con viremias < 50 copias/ml? Los datos publicados sugieren que no se desarrolla resistencia por debajo del umbral de 50 copias/ml<sup>23,35</sup>. Sin embargo, cerca del límite de detección inferior existe una mayor variabilidad intermétodos (<http://www.seimc.org/control/index.asp>) e intraensayo, lo que dificultará la comparación entre diferentes plataformas y cuestionará la validez de los valores obtenidos cerca del límite inferior. Así, por ejemplo, en los controles de calidad anuales de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) existe aproximadamente un 20% de valores que quedan fuera del rango establecido como referencia para esa metodología, pero si analizamos solamente los valores con cargas virales próximos a 100 copias/ml, esa divergencia alcanzaría el 40% (<http://www.seimc.org/control/index.asp>), que llegaría a ser sensiblemente mayor en valores de carga viral 2-5 veces inferiores.

**Tabla 2**  
Coeficientes de correlación de estudios comparativos entre diferentes plataformas para la cuantificación de la carga viral del VIH-1

Coeficiente de correlación		Roche		Abbott		Siemens		BioMérieux	
		Cobas Amplicor	Cobas TaqMan	LCx	RealTime®	bDNA	kPCR	QT	Easy-Q
Roche	Cobas Amplicor		0,96	0,90	0,915-0,964	0,91-0,98	NE	0,85-0,87	0,945
Abbott	Cobas TaqMan			0,91	0,94	0,95	NE	NE	NE
	LCx				0,94	0,96	NE	0,79	NE
	RealTime					0,938-0,97	No	NE	0,91-0,968
Siemens	bDNA								
	kPCR						discrepancias > 0,5 log	0,88	0,945-0,98
BioMérieux	QT						0,86	NE	NE
	Easy-Q								0,91

NE: no ensayado.

**Tabla 3**

Técnicas para la cuantificación del ARN-VHC

Ensayo (fabricante)	Método	Factor de conversión (UI/ml)	Rango dinámico (UI/ml)	Volumen de muestra ( $\mu$ l)	Diana de detección	Licencia FDA	Marca CE
Cobas Amplicor HCV Monitor <sup>®</sup> v2.0 (Roche Molecular Systems)	PCR-TR semiautomatizada	2,7 copias/ml	600-500.000	100 <sup>a</sup> /250-1.050 <sup>b</sup>	5' UTR	Sí	Sí
Versant <sup>®</sup> HCV RNA 3.0 Assay (Siemens Health Care Diagnostics)	<i>Branched</i> semiautomatizada	5,2 copias/ml	615-7.700.000	50	5' UTR	Sí	Sí
Cobas Taqman HCV Test (Roche Molecular Systems)	PCR-TR a tiempo real semiautomatizada/ automatizada <sup>c</sup>		30-200.000.000	1.000	5' UTR	Sí	Sí
Abbott RealTime (Abbott Diagnostics)	PCR-TR a tiempo real semiautomatizada		12-100.000.000	900	5' UTR	No	Sí

<sup>a</sup>Extracción manual.<sup>b</sup>Extracción Ampliprep<sup>®</sup>.<sup>c</sup>Docking Station<sup>®</sup>.

Un aspecto muy delicado en la cuantificación viral que puedan realizar las nuevas plataformas de PCR en tiempo real es la correcta cuantificación de la extensa diversidad viral que presenta este virus (9 subtipos, 7 subtipos [F1, F2 A1-A2, y han sido propuestos A3-A5], más de 43 formas recombinantes e incontables formas únicas). Los polimorfismos en los lugares de unión de los cebadores o sondas podrían subcuantificar la carga vírica en los individuos afectados por estos cambios. Esta sospecha teórica ha sido recientemente documentada, al detectarse que una única mutación en un cebador de Cobas<sup>®</sup> TaqMan HIV-1 de Roche reduce la cuantificación viral en > 2 log, cuando se compara con otros sistemas de cuantificación, incluido Cobas Amplicor Monitor<sup>36</sup>. En este sentido, recientes publicaciones<sup>37,38</sup> que comparan la cuantificación de subtipos no-B entre Versant<sup>®</sup> kPCR y bDNA de Siemens, o entre LCx con RealTime<sup>®</sup> de Abbott, muestran una menor cuantificación de kPCR de  $\geq 0,5$  log en todos los subtipos no-B y > 0,8 log para los subtipos G y H para RealTime<sup>®</sup> de Abbott. Éste será un aspecto que deberá vigilarse en las nuevas plataformas de cuantificación del VIH-1.

La extraordinaria sensibilidad de las nuevas plataformas para la detección y cuantificación viral del VIH requerirá controles estrictos que permitan estimar la precisión de estas nuevas plataformas. Por otra parte, la alta tasa de mutación del virus podría favorecer la aparición de variantes o subtipos poco frecuentes que no fueran cuantificadas correctamente. En ambos casos, los controles de calidad externos permitirán detectar algunas de estas anomalías.

### Métodos comerciales de la carga viral del VHC

La utilización de marcadores moleculares, que como el ARN-VHC, son indicadores directos de la replicación viral y permiten su cuantificación, es esencial para el manejo de los pacientes infectados por el VHC. Las principales aplicaciones de estos marcadores de replicación en la práctica clínica son el diagnóstico de la infección activa, la indicación del tratamiento antiviral y la monitorización de la respuesta a éste. En consecuencia, y tal como se recoge en diferentes recomendaciones y guías terapéuticas, el manejo de la infección por el VHC se basa primordialmente en la medida de la carga viral antes, durante y después del tratamiento<sup>39-41</sup>. Por otra parte, y debido al bajo nivel de virus circulante, la detección y cuantificación del ARN-VHC, o de su señal, requiere del uso de técnicas moleculares para su amplificación. A este respecto, lo ideal es disponer de un ensayo que sea sensible, específico, seguro, preciso, reproducible y que tenga un amplio intervalo dinámico de cuantificación que cubra todas las posibles situaciones clínicas.

Los métodos de cuantificación de la carga viral del VHC que hay disponibles comercialmente se fundamentan en dos técnicas de biología molecular basadas en la amplificación de la señal por hibrida-

ción molecular (bDNA, del inglés *branched* DNA) y en la amplificación de la secuencia diana por PCR de transcripción reversa (PCR-TR) competitiva cuantitativa y PCR-TR a tiempo real. Las características principales de estos métodos, cuyas diferencias fundamentales radican en las sensibilidades, formatos, tiempos y capacidades de procesamiento<sup>42,43</sup>, se muestran en la tabla 3. Además, el sistema deseable para estas técnicas debería ser relativamente rápido, capaz de utilizar un tubo primario, lo más automatizado posible, que utilice poco volumen de muestra y, a ser posible, que sea abierto<sup>43</sup>. Sin embargo, su elección casi siempre se fundamenta más en el rendimiento, en función de la carga de trabajo del laboratorio, que en las prestaciones del mismo.

El sistema Cobas Amplicor<sup>®</sup> fue el primer ensayo semiautomatizado desarrollado para la medida de la carga viral del VHC por PCR-TR. Aunque es un ensayo muy reproducible, en él destaca su baja sensibilidad y rendimiento<sup>42</sup>, lo que ha motivado que su uso haya sido desplazado por los nuevos métodos de PCR a tiempo real.

El sistema Versant<sup>®</sup> HCV-RNA v3.0 Assay se caracteriza, fundamentalmente, por un límite de cuantificación de 615 UI/ml, que es significativamente mayor que en otros sistemas, por lo que va a requerir ensayos complementarios más sensibles para la determinación de la respuesta viral sostenida; para paliar este defecto, en un futuro próximo el fabricante lanzará al mercado un ensayo de PCR a tiempo real (Versant<sup>®</sup> HCV RNA 1.0 Assay kPCR). Por otra parte, este ensayo destaca por su reproducibilidad, que es mayor que la de los métodos de PCR a tiempo real, aunque como sistema presenta un grado de automatización y rendimiento intermedio debido a su largo período de incubación. Este sistema es, por lo tanto, adecuado para laboratorios con una carga de trabajo intermedia<sup>43,44</sup>.

El sistema Cobas AmpliPrep<sup>®</sup>/Cobas<sup>®</sup> TaqMan HCV, integrado en la plataforma modular Docking Station<sup>®</sup>, es el primer sistema basado en PCR a tiempo real que está totalmente automatizado. Se caracteriza por un bajo límite de detección y un elevado rendimiento<sup>43,44</sup>. Es un sistema adaptable a laboratorios con carga de trabajo intermedia/alta, y además no necesita de personal especializado para su manejo. La cuantificación viral del VHC por este método es la utilizada más ampliamente en nuestros laboratorios, tal como se refleja en los últimos estudios realizados por la SEIMC<sup>45-47</sup>. Sin embargo, este ensayo presenta dos puntos críticos: una sobrestimación en los niveles de ARN-VHC, que parece incrementarse en muestras con cargas virales altas<sup>39</sup>, y una subestimación de la carga viral para los genotipos 2 y 4<sup>48-53</sup>.

Por último, el sistema Abbott RealTime HCV Assay es otro método de PCR a tiempo real disponible en la actualidad, que también se caracteriza por un bajo límite de detección y por un rendimiento y grado de automatización intermedios, a los que añade su elevada precisión para cuantificar los diferentes genotipos virales. No obstante, su posibilidad de contaminación suele ser mayor al trabajar

con tubos abiertos<sup>54</sup>. Al igual que el otro sistema de PCR a tiempo real, puede adaptarse a laboratorios con una carga de trabajo intermedia o alta, pero va a necesitar de personal más cualificado para su manejo<sup>44</sup>. Cabe destacar que se trata de un dispositivo especialmente interesante en laboratorios de investigación por tratarse de un sistema abierto.

### *Influencia del genotipo viral*

Con la introducción de la PCR a tiempo real en la determinación de la carga viral del VHC, el protagonismo que ejercía el intervalo dinámico ha dado paso al de la influencia del genotipo viral. Desde un principio, los genotipos del VHC han tenido influencia en los resultados obtenidos con los ensayos comerciales de cuantificación viral<sup>55</sup>. Diversos estudios han demostrado la existencia de diferencias significativas en los valores obtenidos con las distintas técnicas, encontrando esta cuantificación sustancialmente subestimada para los genotipos 1 y 3 en el ensayo de amplificación de la señal de hibridación<sup>48-50</sup> y para los genotipos 2, 3 y 4 en los formatos de tiempo real con sondas TaqMan<sup>48-53</sup>.

La existencia, para cada genotipo del VHC, de polimorfismos dentro de las regiones del genoma que se utilizan como dianas para los cebadores y sondas usados en las diferentes técnicas moleculares, puede dar lugar a alteraciones significativas en el procesamiento técnico y, en consecuencia, comprometer la seguridad de la medición de la carga viral<sup>51</sup>. Probablemente también pueda influir el que la estandarización en unidades internacionales (UI) de los ensayos de carga viral del VHC se ha basado exclusivamente en la utilización de paneles del genotipo 1<sup>50</sup>. Por lo tanto, mientras que la cuantificación del ARN-VHC sea dependiente del genotipo, los valores umbrales establecidos pueden no ser equivalentes para todos los genotipos y, en algunos casos, podrían conducir a decisiones erróneas en la monitorización terapéutica.

### *Evaluación crítica de la determinación de la carga viral del VHC*

Aunque la carga viral no predice la progresión de la hepatitis C y no se asocia con la gravedad de la enfermedad hepática, no es menos cierto que su determinación constituye una labor primordial del laboratorio de microbiología molecular por su valor pronóstico y como guía del tratamiento. En la actualidad, la carga viral del VHC se ha convertido en una prueba habitual para el manejo de los pacientes infectados; sin embargo, no todos los métodos de cuantificación producen resultados equivalentes, a pesar de presentar coeficientes de correlación aceptables en diferentes estudios<sup>48-53</sup>. En consecuencia, los valores para una muestra individual, obtenidos con los diferentes ensayos de cuantificación viral disponibles comercialmente, no pueden utilizarse de manera intercambiable, a pesar de su calibración con unidades internacionales. La implicación práctica de esta variabilidad es que la monitorización de los pacientes en tratamiento puede estar erróneamente alterada si el método y el laboratorio utilizados se cambian en el transcurso de aquél. Por lo tanto, conviene señalar que el uso de la cinética de replicación del VHC para guiar la terapia está limitado por el rango dinámico y la variabilidad de las pruebas de laboratorio. A este respecto, los controles de calidad de la SEIMC para con la carga viral del VHC de los últimos años han puesto de manifiesto la gran variabilidad interlaboratorios existente para algunas de estas técnicas<sup>45-47</sup>. En consecuencia, los microbiólogos moleculares deberán estar informados sobre estas diferencias, para asegurar el cuidado apropiado del paciente infectado, aconsejando al clínico de la necesidad de ser cautos al interpretar las recomendaciones de los algoritmos de monitorización del tratamiento cuando los resultados de las técnicas de cuantificación están próximos a los umbrales de decisión.

El desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real ha permitido disponer de ensayos mucho más sensibles, con un formato susceptible

de ser automatizado, con un menor riesgo de contaminación por arrastre y, sobre todo, con un rango dinámico de cuantificación mucho más amplio, que proporcionan una cuantificación precisa de la carga viral, lo que las hace especialmente útiles para la monitorización del tratamiento antiviral. La sensibilidad de estas técnicas se aproxima a la de los ensayos cualitativos más sensibles, permitiendo la posibilidad de utilizar una sola prueba para el manejo integral del paciente infectado. A este respecto, conviene destacar que, aunque siempre se ha dicho que las pruebas más sensibles pueden tener un valor añadido en el análisis de la respuesta al tratamiento, no existe evidencia en la bibliografía que justifique el uso de ensayos ultrasensibles; en consecuencia, los ensayos cuantitativos en tiempo real van a obviar la necesidad de separar ensayos cualitativos y cuantitativos.

Por lo que respecta a la influencia del genotipo viral, creemos que es importante realizar evaluaciones en cuanto a la seguridad y la sensibilidad de los equipos comerciales para la cuantificación del ARN-VHC utilizando muestras clínicas pertenecientes a una diversidad de genotipos virales que sea representativa de la distribución existente donde se vayan a usar. En este sentido, y como sugerencia, los controles de calidad de la SEIMC deberían incluir muestras representativas de la diversidad genética observada en su área de estudio.

Por último, es necesario resaltar que los resultados del examen del programa externo de calidad de la SEIMC de carga viral del VHC muestran la utilidad de los programas de intercomparación externos, y destacan la conveniencia de continuar en una línea que la SEIMC considera prioritaria para sus objetivos profesionales. A tal fin, y en vista de los resultados<sup>45-47</sup>, es importante que los laboratorios mantengan un alto grado de exigencia durante la realización habitual de estas pruebas y perseveren sobre la calidad de los resultados en el día a día, y en caso de que sea necesario, que introduzcan las medidas correctoras oportunas.

### **Declaración de conflicto de intereses**

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

### **Bibliografía**

1. Fahey JL, Taylor JM, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, et al. *N Engl J Med.* 1990;322:166-72.
2. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science.* 1996;272:1167-70.
3. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med.* 1995;122:573-9.
4. de Wolf F, Spijkerman I, Schellekens P, Langendam M, Kuiken C, Bakker M, et al. AIDS prognosis based on HIV-1 RNA, CD4+ T-cell count and function: markers with reciprocal predictive value over time after seroconversion. *AIDS.* 1997;11:1799-806.
5. Mellors JW, Margolick JB, Phair JP, Rinaldo CR, Detels R, Jacobson LP, et al. Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection. *JAMA.* 2007;297:2349-50.
6. Langford SE, Ananworanich J, Cooper DA. Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Res Ther.* 2007;4:11.
7. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services.; 1-139 [actualizado: 3 de noviembre de 2008]. Disponible en: <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.
8. Anónimo, WHO. Recommendations for antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. Key findings and recommendations from consultations with people living with HIV [actualizado: 31 de agosto de 2009]. Disponible en: [http://www.gnpplus.net/images/stories/20090831\\_findings\\_and\\_recommendations\\_phiv\\_consultations.pdf](http://www.gnpplus.net/images/stories/20090831_findings_and_recommendations_phiv_consultations.pdf).
9. Panel de expertos de GESIDA y 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 [actualizado: febrero de 2009]. Disponible en: <http://www.msps.es/ciudadanos/enfLecciones/enTransmisibles/sida/docs/recomendacionesGesidaPNSTARVfebrero2009.pdf>.

10. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. 1986;51:263.
11. FDA Advisor Committee Recommends Approval for Roche's Amplicor HIV Monitor Test. The first standardized PCR test to measure HIV levels in blood. 1996. Disponible en: <http://www.aegis.com/news/pr/1996/PR960326.html>.
12. Zanchetta N, Nardi G, Tocalli L, Drago L, Bossi C, Pulvirenti FR, et al. Evaluation of the Abbott LCx HIV-1 RNA quantitative, a new assay for quantitative determination of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3882-6.
13. Abbott LCx probes system. Abbott Laboratories, folleto técnico.
14. Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, Schukink R, Dircks M, Adriaanse H, et al. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Methods.* 1991;35:273-86.
15. NucliSens HIV-1 QT BioMérieux, package insert. 2001. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/PremarketApprovalsPMAs/ucm091370.pdf>.
16. Urdea MS, Wilber JC, Yeghiazarian T, Todd JA, Kern DG, Fong SJ, et al. Direct and quantitative detection of HIV-1 RNA in human plasma with a branched DNA signal amplification assay. *AIDS* 1993;7 Suppl 2:S11-4.
17. Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay Siemens Mediacal Solution 2002. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/PremarketApprovalsPMAs/ucm091276.pdf>.
18. Schmitt Y. Performance characteristics of quantification assays for human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Virol.* 2001;20:31-3.
19. Chernoff DN. The significance of HIV viral load assay precision: a review of the package insert specifications of two commercial kits. *J Int Assoc Physicians AIDS Care.* 2002;1:134-40.
20. Rouet F, Chaix ML, Nerrienet E, Ngo-Giang-Huong N, Plantier JC, Burgard, et al. Impact of HIV-1 genetic diversity on plasma HIV-1 RNA quantification: usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA second-generation long terminal repeat-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction test. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45:380-8.
21. Drexler JF, de Souza Luna LK, Pedroso C, Pedral-Sampaio DB, Queiroz ATL, Brites E, et al. Rates of and reasons for failure of commercial human immunodeficiency virus type 1 viral load assays in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2061-3.
22. Raboud JM, Rae S, Hogg RS, Yip B, Sherlock CH, Harrigan PR, et al. Suppression of plasma virus load below the detection limit of a human immunodeficiency virus kit is associated with longer virologic response than suppression below the limit of quantitation. *J Infect Dis.* 1999;180:1347-50.
23. Kieffer TL, Finucane MM, Nettles RE, Quinn TC, Broman KW, Ray SC, et al. Genotypic analysis of HIV-1 drug resistance at the limit of detection: virus production without evolution in treated adults with undetectable HIV loads. *J Infect Dis.* 2004;189:1452-65.
24. Nettles RE, Kieffer TL, Simmons RP, Cofrancesco 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.
25. Holguin A, de Mulder M, Yebra G, Lopez M, Soriano V. Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. *Curr HIV Res.* 2008;6:327-34.
26. Geretti AM. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19:1-7.
27. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques.* 2005;39:75-85.
28. Roche Molecular System COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, 48 Tests. 2007. Disponible en: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/PremarketApprovalsPMAs/ucm091618.htm>.
29. Abbott Molecular. Abbott RealTime HIV-1 Amplification Reagent Kit, Abbott. 2007. Disponible en: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/PremarketApprovalsPMAs/ucm089797.htm>.
30. Siemens Healthcare Diagnostics. Versant HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR). 2008. Folleto técnico.
31. van Deursen P, Verhoeven A, de Bie P, Bertens L, de Jong J. Measuring human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in dried blood spot specimens using NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0. ECCMID. 2009. Helsinki, Finlandia, comunicación P539.
32. Choi JY, Kim EJ, Rho HJ, Kim JY, Kwon OK, Lee JH, et al. Evaluation of the NucliSENS EasyQ HIV-1 v1.1 and RealTime HIV-1 kits for quantitation of HIV-1 RNA in plasma. *J Virol Methods.* 2009;161:7-11.
33. Foulongne V, Montes B, Didelot-Rousseau MN, Segondy M. Comparison of the LCx human immunodeficiency virus (HIV) RNA quantitative, RealTime HIV, and COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan assays for quantitation of HIV type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2963-6.
34. Gatanaga H, Tsukada K, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Watanabe T, et al. Detection of HIV type 1 load by the Roche Cobas TaqMan assay in patients with viral loads previously undetectable by the Roche Cobas Amplicor Monitor. *Clin Infect Dis.* 2009;48:260-2.
35. Joos B, Fischer M, Kuster H, Pillai SK, Wong JK, Böni J, et al. HIV rebounds from latently infected cells, rather than from continuing low-level replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:16725-30.
36. Korn K, Weissbrich B, Henke-Gendo C, Heim A, Jauer CM, Taylor N, et al. Single-point mutations causing more than 100-fold underestimation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) load with the Cobas TaqMan HIV-1 real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1238-40.
37. Troppan KT, Stelzl E, Violan D, Winkler M, Kessler HH. Evaluation of the new VERSANT HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR) for quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Virol.* 2009;46:69-74.
38. Garcia-Diaz A, Clewley GS, Booth CL, Labett W, McAllister N, Geretti AM. Comparative evaluation of the performance of the Abbott real-time human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assay for measurement of HIV-1 plasma viral load following automated specimen preparation. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1788-91.
39. Davis GL. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36 Suppl 1:S145-51.
40. Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, Zachoval R, et al. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: Significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology.* 2003;37:600-9.
41. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff B. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology.* 2009;49:1335-74.
42. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology.* 2002;122:1554-68.
43. Schutten M. Comparison of the Abbott Realtime HIV-1 and HCV viral load assays with commercial competitor assays. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008;8:369-77.
44. Vermehren J, Kau A, Gärtner BC, Göbel R, Zeuzem S, Sarrazin C. Differences between two real-time PCR-based hepatitis C virus (HCV) assays (RealTime HCV and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan) and one signal amplification assay (Versant HCV RNA 3.0) for RNA detection and quantification. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3880-91.
45. Orta N, Guna MR, Latorre JC, Pérez JL, Gimeno C. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC de carga viral del VIH-1 y del VHC. Año 2006. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25 Supl 3:S8-13.
46. Orta N, Guna MR, Latorre JC, Ovies M, Pérez JL, Gimeno C. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC de carga viral del VIH-1 y del VHC. Año 2007. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26 Supl 13:S8-13.
47. Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Análisis del control de carga viral VHC. Año 2008. Disponible en: <http://seimc.org/control/>.
48. Caliendo AM, Valsamakis A, Zhou Y, Yen-Lieberman B, Andersen J, Young S, et al. Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1726-32.
49. Colson P, Motte A, Tamalet C. Broad differences between the COBAS AmpliPrep total nucleic acid isolation-COBAS TaqMan 48 hepatitis C virus (HCV) and COBAS HCV Monitor v2.0 assays for quantification of serum HCV RNA of non-1 genotypes. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1602-3.
50. Sarrazin C, Gärtner BC, Sizmman D, Babiell R, Mihm U, Hofmann WP, et al. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin Microbiol.* 2006;44:729-37.
51. Tuailon E, Mondain AM, Ottomani L, Roudière L, Perney P, Picot MC, et al. Impact of hepatitis C virus (HCV) genotypes on quantification of HCV RNA in serum by COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV test, Abbott HCV RealTime assay, and VERSANT HCV RNA Assay. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3077-81.
52. Sizmman D, Boeck C, Boelter J, Fischer D, Miethke M, Nicolaus S, et al. Fully automated quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA in human plasma and human serum by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. *J Clin Virol.* 2007;38:326-33.
53. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlostky JM. Overestimation and underestimation of hepatitis C virus RNA levels in a widely used real-time polymerase chain reaction-based method. *Hepatology.* 2007;46:22-31.
54. Pyne MT, Konnick EQ, Phansalkar A, Hillyard DR. Evaluation of the Abbott investigational use only RealTime hepatitis C virus (HCV) assay and comparison to the Roche TaqMan HCV analyte-specific reagent assay. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2872-8.
55. Mellors J, Hawkins A, Simmonds P. Genotype dependence of hepatitis C virus load measurement in commercially available quantitative assays. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2525-32.