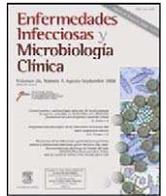


# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Formación médica continuada: Infección por el VIH en el adulto

## Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales<sup>☆</sup>

Federico García<sup>a,\*</sup>, Marta Álvarez<sup>a</sup>, Carmen Bernal<sup>a,b</sup>, Natalia Chueca<sup>a</sup> y Vicente Guillot<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Granada España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 12 de diciembre de 2010

Aceptado el 14 de diciembre de 2010

On-line el 23 de febrero de 2011

#### Palabras clave:

VIH  
Diagnóstico de laboratorio  
Monitorización

#### Keywords:

HIV  
Laboratory diagnosis  
Monitoring

### R E S U M E N

En el diagnóstico de la infección VIH, para considerar un resultado positivo, se recomienda el uso de tres técnicas con distinto principio o base antigénica, siendo obligado que para la confirmación una de ellas sea el Western Blot. Las técnicas serológicas de cuarta generación acortan el período ventana a 13-15 días, debido a que incluyen la detección de antígeno-p24. La detección del genoma-VIH (ADN proviral/ARN) complementa al diagnóstico serológico en situaciones complejas. La viremia plasmática (carga viral) se utiliza para el seguimiento de los pacientes infectados por VIH, para contribuir a la decisión del inicio de tratamiento y para comprobar el fallo virológico al régimen antirretroviral en uso. Las pruebas de resistencia se utilizan para guiar el cambio de tratamiento, y para detectar la transmisión de cepas resistentes en los nuevos diagnósticos. Antes de utilizar un antagonista de CCR5 hay que determinar el tropismo viral; para ello, se pueden utilizar métodos genotípicos, accesibles a los laboratorios de diagnóstico, o fenotípicos, de más difícil acceso.

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

### Laboratory diagnosis of HIV infection, viral tropism and resistance to antiretrovirals

#### A B S T R A C T

The accurate diagnosis of HIV infection demands that to consider a positive result, at least three assays with different antigenic base should be used, one of them, Western-Blot being mandatory for confirmation. Fourth generation ELISAs shorten the window phase to 13-15 days, as they now include p24 antigen detection. Proviral DNA or Viral RNA detection by molecular methods have proved useful for addressing complex situations in which serology was inconclusive. Viral load (HIV-RNA) is routinely used to follow-up HIV infected patients and is used for treatment initiation decisions. It is also used to monitor viral failure. When this happens, resistance tests are needed to guide treatment changes. Resistance is also used to assess the transmission of drug resistance to newly diagnosed patients. Finally, before using an anti-CCR5 drug, viral tropism needs to be determined. This can be done using genotypic tests, widely available in many HIV labs, or phenotypic tests, only available at certain sites.

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

### Introducción

A mediados de la década de 1980 se introdujo el diagnóstico del VIH para identificar individuos con sospecha de infección por dicho virus. Durante estos 25 años, las pruebas diagnósticas han tenido un gran desarrollo como consecuencia del progreso en los

conocimientos de los mecanismos inmunopatogénicos, de la relación hospedador-virus, de los mecanismos de replicación vírica, y de la respuesta inmune que sucede en los individuos infectados en el curso de la infección. Los adelantos en la tecnología, principalmente los avances en técnicas de biología molecular a través de la incorporación de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), sin duda han contribuido a implementar métodos de laboratorio de inestimable valor para el manejo del paciente VIH. En este capítulo se revisarán los principales métodos disponibles para el diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, y para la determinación de las resistencias a los antirretrovirales y del tropismo viral.

<sup>☆</sup> Nota: sección acreditada por el SEAFORMEC. Consultar preguntas de cada artículo en: <http://www.elsevier.es/eimc/formacion>.

\* Autor para correspondencia.

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

## Marcadores inmunológicos y virológicos durante la infección

En el curso de la infección se pueden utilizar varios marcadores víricos para identificar la infección y monitorizar su tratamiento. La cinética y el momento de aparición de cada uno de ellos es distinto, y la elección del marcador a detectar va a depender del objetivo del diagnóstico<sup>1</sup>. El primer marcador que aparece tras la infección es el ARN-VIH que se puede detectar por técnicas de amplificación aproximadamente a las dos semanas de la infección, generalmente a los 10-12 días. Prácticamente al mismo tiempo que el ARN-VIH, se puede detectar el ADN de VIH integrado en el genoma celular (ADN proviral). El antígeno p24 aparece en suero a los 11-13 días, y se puede detectar, con las técnicas de máxima sensibilidad, aproximadamente durante 1 mes y medio<sup>2</sup>. Los anticuerpos se detectan en el suero a las tres o cuatro semanas de la infección, con una media de 22 días, y alcanzan su concentración máxima a las 10-12 semanas<sup>3</sup>. Cuando aparecen los anticuerpos, disminuyen los niveles de viremia y desaparece el antígeno p24 como consecuencia de la formación de inmunocomplejos<sup>1</sup>.

El intervalo de tiempo que existe entre la infección y la aparición de anticuerpos o seroconversión, se conoce como período ventana, y se caracteriza por presencia de ADN proviral, ARN-VIH, antígeno p24 y ausencia de anticuerpos específicos.

## Técnicas de detección de infección VIH

El diagnóstico de infección se realiza detectando la presencia de anticuerpos específicos ya que estos se encuentran en el suero prácticamente en el 100% de las personas infectadas.

Con objeto de minimizar el riesgo de obtener un resultado falsamente negativo todas las técnicas son extremadamente sensibles, y capaces de detectar anticuerpos de baja avidéz por antígeno que se producen sólo en las fases tempranas de la infección. La sensibilidad es del 99%, hay que señalar que es imposible conseguir un 100% porque la seroconversión no ocurre hasta las 3-4 semanas y además pueden existir infectados seronegativos como consecuencia de defectos inmunitarios.

El incremento de la sensibilidad lleva aparejado un descenso de la especificidad (se producen falsos positivos), aunque las técnicas actuales cifran la especificidad en torno al 99%. Por otro lado, a menor prevalencia de la infección VIH en la población estudiada, disminuye el valor predictivo positivo y es por tanto mayor la probabilidad de que se produzcan resultados falsos positivos con tasas de infección por VIH bajas. Por ello, todo resultado positivo debe ser confirmado mediante un test confirmatorio<sup>1</sup>.

### Técnicas de screening: ELISA

La calidad diagnóstica del ELISA viene determinada por una cuidadosa selección del punto de corte o "cut-off" y sobre todo por la base antigénica utilizada que captura los anticuerpos específicos presentes en la muestra. Las primeras técnicas se desarrollaron en 1985, usaban como base antigénica un lisado vírico, y se detectaban los anticuerpos a los 40 días de la infección<sup>1</sup>. En 1987 se introdujeron las técnicas de segunda generación que incorporaban como antígenos proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, y nuevos antígenos que permitieron detectar anticuerpos frente a todos los subtipos M, y los grupos N y O, y frente a VIH-2. Se consiguió incrementar la sensibilidad, detectándose los anticuerpos a los 33-35 días tras la infección<sup>4</sup>. En 1994 las técnicas de ELISA adquirieron el formato "en sándwich", se denominaron ELISA de tercera generación, detectan anticuerpos de clase IgG e IgM, y por ello se acorta el período ventana a 22 días<sup>4</sup>. Estas técnicas se han modificado utilizando sustratos fluorescentes (ELFA) o formatos de

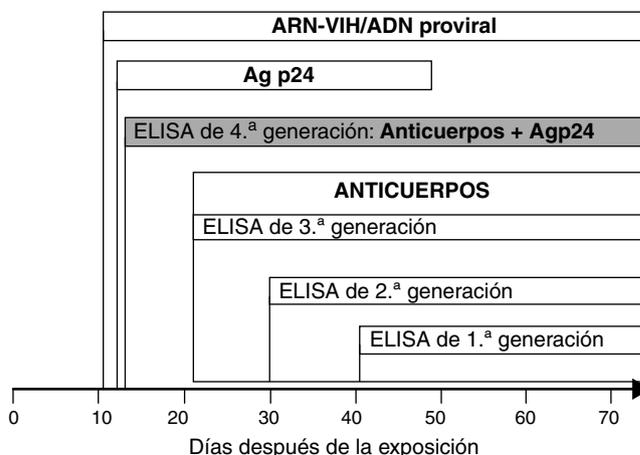


Figura 1. Tiempo de aparición de marcadores específicos de infección VIH.

quimioluminiscencia, lo que permite la automatización, el procesamiento de un gran número de muestras, la reducción de manipulación y de los costes<sup>5</sup>. Recientemente se han introducido las técnicas de cuarta generación que permiten la detección simultánea de anticuerpos y antígeno p24, reduciéndose el período ventana a 13-15 días, es decir, se aproxima casi a la detección de ARN-VIH<sup>4</sup> (fig. 1). Con estas técnicas la sensibilidad se incrementa hasta un 99,9% lo que reduce la posibilidad de un resultado falsamente negativo, esto indica que en principio un resultado negativo no requiere confirmación ni seguimiento serológico, excepto en personas con alto riesgo de adquirir la infección<sup>6</sup>. Hay que tener en cuenta, que se pueden producir falsos negativos en fases iniciales de la infección hasta que se produce la seroconversión, en estadios finales de la misma, en pacientes con tratamiento inmunosupresor, trasplantados de médula ósea, personas con alteraciones de linfocitos B, en pacientes con hipogammaglobulinemia, infectados por tipos de VIH no detectados por la base antigénica, o por un error en la identificación de la muestra<sup>5</sup>. La especificidad se sitúa entre el 99,5% y 99,9% y se pueden producir falsos positivos como consecuencia de reconocimientos no específicos de sustancias del suero por los antígenos víricos de la base antigénica. Los factores que pueden estar implicados en la falsa reactividad son la base antigénica utilizada, la inactivación de las muestras por calor, los errores en la identificación de las mismas, y la hemólisis, aspecto lipídico y contaminación microbiana del suero. Se han descrito falsos positivos en múltiparas, hemodializados, multitransfundidos, pacientes con hepatitis alcohólica, personas con infecciones agudas por otros virus como herpes y VHB, vacunados frente a VHB e *Influenzavirus*, pacientes con enfermedades autoinmunes, lupus eritematoso diseminado, y personas con anticuerpos frente a diversos antígenos HLA<sup>1,5,6</sup>. Debido a la posibilidad de estas reactividades no específicas hay que recurrir a las pruebas confirmatorias para verificar los resultados positivos de las técnicas de screening.

### Técnicas rápidas

A veces se pueden plantear situaciones urgentes y por ello se han desarrollado técnicas de ejecución rápida, que no necesitan aparataje y se pueden interpretar a simple vista. Se basan en la aglutinación de partículas sensibilizadas de látex, o eritrocitos, técnicas de Dot-inmunoensayo y de inmunocromatografía capilar<sup>7</sup>. La sensibilidad oscila entre el 85-99%<sup>8,9</sup>, y la especificidad entre el 93-99%. Se suelen producir falsos negativos en muestras con bajo nivel de anticuerpos o estadios recientes de infección<sup>10</sup>, y falsos positivos en regiones con alta prevalencia de anticuerpos<sup>11</sup>.

## Ensayos confirmatorios

Las técnicas confirmatorias que se utilizan más frecuentemente son el Western Blot (WB) y el inmunoblot recombinante o inmunoensayo en línea (LIA) que tienen como mínimo la misma sensibilidad que el ELISA y una especificidad superior. Ambas técnicas pueden incorporar antígenos de envoltura de VIH-2 lo que permite diagnosticar este tipo vírico.

El Western Blot es una metodología en la cual las distintas proteínas víricas se separan en función de su peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa sobre la que se añade e incuba el suero del paciente, la unión antígeno-anticuerpo se detecta mediante una técnica de ELISA. Si el suero posee anticuerpos frente a una proteína se produce una banda coloreada que define la reactividad en WB. Detecta anticuerpos frente a las glicoproteínas de envoltura gp160, gp120 y gp41, las codificadas por el gen gag p55, p24 y p17 y las proteínas enzimáticas p66, p51 y p31<sup>1</sup>. Existen casas comerciales que incluyen al menos una proteína del gen env de VIH-2 lo que permite identificar las infecciones producidas por dicho tipo vírico.

En el momento actual esta metodología se ha semiautomatizado lo que facilita su realización, pero los resultados pueden ser subjetivos, ya que lectura se basa en la observación de la presencia de bandas coloreadas que corresponden a las distintas proteínas víricas<sup>5</sup>. Por ello, en cada laboratorio se debe establecer una disciplina de lectura de reactividades.

La "interpretación" de los resultados es uno de los mayores puntos conflictivos en la serología VIH, se considera negativo la ausencia total de reactividad; para valorar la positividad existen numerosos criterios, según el *Center for Disease Control* (CDC) se considera positivo cuando se detectan al menos 2 bandas de p24, gp41, y gp160/gp120, la OMS reconoce una prueba positiva con 2 bandas, el ARC (Cruz Roja Americana) indica que deben existir tres bandas una de cada gen estructural, y el Consorcio de Estandarización de la Serología de Retrovirus indica que debe existir al menos una de gp120 o gp160 y una de p24 o p31<sup>2,12,13</sup>. Cada laboratorio debe establecer sus propios criterios de acuerdo a las indicaciones de la técnica que se utilice. Se interpreta como "indeterminado" cualquier reactividad que no reúna el criterio mínimo de positividad y es en esta categoría donde surgen mas controversias ya que las causas del WB indeterminado son diversas y pueden corresponder a fases tempranas o estadios avanzados de la infección con deterioro inmunológico grave, y presencia de inmunocomplejos que pueden reducir los anticuerpos circulantes, recién nacidos de madre VIH positiva, a sueros hemolizados, inactivados por calor, con factor reumatoide, o con bilirrubina elevada, a reacciones cruzadas con otros retrovirus, sueros de pacientes infectados por subtipo no B o con hipergammaglobulinemia secundaria a la hiperestimulación antigénica, multitransfundidos, o a situaciones patológicas como conectivopatía, gammapatía policlonal y lupus eritematoso diseminado<sup>5</sup>. La posibilidad de un WB indeterminado o incluso negativo se incrementa cuando se realiza el *screening* con técnicas de cuarta generación, debido a que las mismas detectan antígeno y la positividad de de dicha técnica puede deberse casi exclusivamente a antígeno p24 libre sérico. Por todo ello, un resultado indeterminado debe ser evaluado minuciosamente valorando la historia clínica del paciente, las prácticas de riesgo y la posibilidad de una infección reciente por VIH. Es importante observar el patrón de reactividades ya que si se detecta alguna banda de envoltura con o sin bandas del gen gag, puede deberse a infección VIH, en estas situaciones se debe recurrir a otras pruebas confirmatorias (LIA o IFI)<sup>14</sup> y en ocasiones es necesario complementarlas con la determinación de ADN proviral o carga viral o antígeno p24 libre sérico para valorar una posible primoinfección<sup>12</sup>. En cualquier caso ante un Western Blot indeterminado se debe solicitar siempre una nueva muestra<sup>5</sup>.

En la repetición con el nuevo suero, pueden existir varias posibilidades, la primera es que la técnica de *screening* se mantenga positiva y no se detecten cambios en el WB respecto al primero, o incluso se produzca una disminución en el número de bandas y en intensidad, en este caso la posibilidad de una reacción inespecífica es alta, y el paciente debe ser tranquilizado. Se debe solicitar una nueva muestra en un mes y comprobar que las bandas se mantienen o desaparecen para dar una respuesta final. Hay que destacar, que en la mayoría de casos estas situaciones se producen en sueros con valores muy cercanos al punto de corte en las técnicas de *screening*. Si en el suero de repetición la técnica de *screening* se mantiene positiva y se observan más bandas y un incremento en la intensidad de las mismas, probablemente sea debido a una seroconversión, en cuyo caso se informará como positivo si reúne los criterios de positividad, o se solicitará una nueva muestra si sigue interpretándose como indeterminado<sup>6</sup>. El CDC recomienda realizar un seguimiento de 6 meses en los WB indeterminados, y si el patrón de WB se mantiene estable, el resultado se debe considerar negativo en individuos sin sintomatología y riesgo bajo de infección.

## Detección de antigenemia

La detección de anticuerpos específicos, indican exposición al virus e infección, y la detección directa del antígeno viral p24 introduce un concepto dinámico en la serología ya que al ser un índice de replicación viral, aporta información sobre el estado actual de la infección. Se detecta en estadios iniciales de infección, o en evolución a SIDA, y sirve de apoyo al diagnóstico serológico en aquellas situaciones en las que la detección de anticuerpos no es concluyente<sup>8</sup>.

El antígeno p24 se puede determinar en suero y plasma con técnicas de ELISA de captura que aumentan la sensibilidad que en el momento actual puede llegar a ser de 8 pg/ml, lo que según algunos estudios puede equivaler a 5.000-10.000 copias de ARN de VIH.

## Ensayos para la detección de infecciones recientes por VIH

La identificación de infecciones recientes es importante para conocer el patrón de transmisión de VIH en una comunidad o población. En la primera fase de la infección existen títulos bajos de anticuerpos y anticuerpos de baja avidéz; cuando la infección progresa la concentración de anticuerpos y la avidéz de los mismos se incrementa. Los métodos que permiten diferenciar una infección reciente de una crónica basados en la detección de anticuerpos se agrupan bajo el término STARHS (algoritmo serológico para la detección de infección reciente por el VIH) que se basa en la aplicación de dos técnicas de ELISA para detectar anticuerpos VIH, una de ellas modificada para que sea menos sensible. Se considera una infección reciente si la muestra es positiva para ELISA convencional y negativa en el ELISA modificado de baja sensibilidad<sup>9</sup>. También se pueden identificar infecciones recientes usando el índice de avidéz. Para ello se procesa el suero por duplicado (diluído con PBS y tratado con guanidina que interfiere en la unión antígeno-anticuerpo de baja avidéz). Tras el procesamiento de ambos sueros se calcula el índice de avidéz dividiendo la señal obtenida del suero tratado con PBS/guanidina. Si el índice es < 0,6 se puede considerar con una probabilidad elevada que la infección ha ocurrido en los 6 meses anteriores<sup>15</sup>. Hay que destacar, que estas técnicas se utilizan con fines epidemiológicos, para conocer el patrón de transmisión de VIH y poder diseñar medidas preventivas adecuadas.

## Determinación de ADN proviral

El ADN proviral se corresponde con el genoma viral integrado en el genoma de la célula a la que el virus infecta. En la actualidad, esta determinación está siendo reemplazada por la determinación

de carga viral (ARN-VIH), en gran parte debido a las dificultades de disponer de ensayos comerciales para determinar ADN proviral, con suficientes controles de calidad y certificación por agencias reguladoras, además de que para su realización se debe utilizar sangre total. Sin embargo, es la determinación de referencia a la hora de utilizar los métodos moleculares para diagnosticar la infección VIH. En este sentido juega un papel importante para complementar aquellas situaciones diagnósticas en las que la serología no es concluyente. Se puede utilizar para valorar la transmisión madre-hijo en el diagnóstico de la transmisión vertical de VIH y para el seguimiento de la profilaxis post-exposición, aunque, como veremos a continuación, la mayoría de los laboratorios utilizan la carga viral de VIH en estos escenarios.

#### *Determinación de la viremia plasmática (carga viral)*

La viremia plasmática o carga viral del VIH se define como el número de copias de ARN del virus que se encuentra presentes en plasma. Su determinación, junto con la cifra de linfocitos CD4 y la situación clínica del paciente, se emplea para establecer las decisiones terapéuticas y para la monitorización del tratamiento antirretroviral<sup>16</sup>. Es uno de los factores a valorar para decidir si se debe iniciar el tratamiento, si bien el principal indicador en estos casos es el recuento de linfocitos CD4<sup>17</sup>.

El objetivo del tratamiento es reducir la carga viral de modo rápido por debajo de los límites de detección (< 50 copias/mL) y mantenerla suprimida el mayor tiempo posible, ya que con este nivel de carga viral se ha demostrado que no se seleccionan mutaciones de resistencia. Una vez instaurado el tratamiento, la carga viral disminuye rápidamente (1-2 log<sub>10</sub>) en las primeras semanas y algo más lentamente a partir del primer mes de tratamiento, si el régimen no incluye un inhibidor de la integrasa, hasta conseguir un nivel estable por debajo del límite de detección que se correlaciona con una mayor duración de la respuesta virológica. En general, se recomienda una determinación al comienzo del tratamiento, y después a las 4 semanas, y cada 4-8 semanas hasta conseguir la supresión. El seguimiento posterior se debería realizar cada 3-4 meses durante al menos el primer año<sup>18</sup>. La potencia, eficacia, tolerabilidad y facilidad de dosificación de los nuevos tratamientos, además de la situación económica actual están planteando la revisión de estas pautas de monitorización. De hecho, una vez que la replicación viral es suprimida, los intervalos de monitorización se pueden extender hasta los 6 meses entre los pacientes que permanecen virológicamente suprimidos y tienen un nivel de recuento de CD4 por encima de los 350 células/ $\mu$ l. Se requiere una monitorización más estrecha en aquellos pacientes que han necesitado cambiar su tratamiento debido al fracaso virológico<sup>19</sup>.

En los pacientes con carga viral controlada se ha observado ocasionalmente brotes transitorios de viremia de bajo nivel (*blips*) que vuelve espontáneamente a ser indetectable sin ningún cambio en el tratamiento. Se desconoce la patogenia de los *blips*; aunque diversos estudios sugieren que un pequeño porcentaje de pacientes pueden desarrollar fracaso virológico con aparición de mutaciones de resistencia, en general, no los relacionan con fracaso virológico.

Se considera que hay un fracaso virológico cuando la carga viral es detectable a las 24 semanas de comenzado el tratamiento antirretroviral, o si tras alcanzar la indetectabilidad ésta vuelve a ser detectable en dos determinación consecutivas separados en al menos un mes. En esta segunda situación, primero hemos de tener en cuenta la tolerabilidad del tratamiento, las interacciones entre fármacos, y la adherencia del paciente.

En la actualidad existen diversas técnicas para la cuantificación de la carga viral que tan solo difieren en sus formatos, tiempos y capacidad de procesamiento. Algunas permiten la detección hasta un nivel de 20 copias de ARN de VIH por mililitro de plasma, sin embargo, todavía se desconocen las implicaciones clínicas de una

viremia entre 20 y 50 copias/ml. En el mercado existen sistemas basados en la amplificación de la señal (*branched-DNA*) o en la amplificación de la secuencia (RT-PCR en tiempo real, NASBA y LCx). Las técnicas de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real basadas en sondas fluorescentes son, en general, más rápidas y permiten rangos dinámicos más amplios (20-10<sup>7</sup> copias/ml). Todas las técnicas detectan y cuantifican el subtipo B, que es el más prevalente en nuestro medio, así como los subtipos circulantes más frecuentes. Sin embargo, ninguna de las técnicas detecta el VIH-2. Por último, se han desarrollado ensayos, no comerciales y utilizados en investigación, que permiten detectar una sola copia de ARN-VIH-1<sup>20</sup>

Es necesario destacar, que la elevada sensibilidad de los ensayos de cuantificación de la carga viral del VIH puede originar un uso inapropiado del mismo, como ocurre cuando se utilizan para el diagnóstico precoz de la infección por VIH. Las pruebas de carga viral no han sido desarrolladas con una especificidad suficiente y pueden causar falsos positivos<sup>21</sup>, en estas situaciones es preferible utilizar otras pruebas genéticas de tipo cualitativo con sensibilidad y especificidad ampliamente demostrada, como el ADN proviral. Sin embargo, existen situaciones especiales en que la determinación de la carga viral se pueda usar como diagnóstico de la infección por VIH, como es el caso de niños recién nacidos de madres seropositivas o en la primoinfección, cuando el diagnóstico serológico está comprometido. Se considerarán válidos sólo aquellos resultados en los que el nivel de viremia sea elevado, si no es preferible descartar la infección mediante el uso de otras pruebas.

#### *Algoritmo diagnóstico*

Cuando el objetivo de las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH es el diagnóstico de infección y la prevalencia de la misma es inferior al 10%, se recomienda el uso de tres técnicas con distinto principio o base antigénica, siendo obligado que una de ellas sea el Western Blot. Para diagnosticar a una persona como positiva las tres pruebas deben ser positivas. En la figura 2 se refleja el algoritmo diagnóstico de la infección VIH.

#### **Pruebas para la detección de resistencias a antirretrovirales**

El conocimiento de los mecanismos que llevan a la selección de resistencias y de sus consecuencias (fracaso terapéutico), así como del perfil de resistencia de cada fármaco, junto con la posibilidad de detectar su presencia mediante ensayos que se pueden llevar a cabo en laboratorios de diagnóstico clínico, han modificado la forma de utilización de la terapia antirretroviral.

Entre las técnicas disponibles para la detección de resistencias se encuentran los métodos «fenotípicos», consistentes en enfrentar al virus a diferentes concentraciones de un determinado fármaco y establecer el grado de inhibición comparando con cepas control, y los métodos «genotípicos», que emplean el análisis de la secuencia de ácidos nucleicos del virus para detectar la presencia de mutaciones de resistencia<sup>22,23</sup>. Las pruebas genotípicas son las que tienen mayor difusión entre los laboratorios de diagnóstico, mientras que los ensayos fenotípicos quedan reservados para laboratorios de investigación. A principios de esta década, se realizaron numerosos estudios que avalaron la utilización de las pruebas de resistencias en la práctica clínica, y que propiciaron que estos ensayos se recomendaran en todas las guías de práctica clínica sobre tratamiento antirretroviral. Las principales características de estos estudios se muestran en la tabla 1. Los ensayos genotípicos exigen que la base molecular de las resistencias esté suficientemente caracterizada, de tal forma que la detección de una mutación sea predictiva de la falta de actividad de un determinado agente. Por esta razón, estas

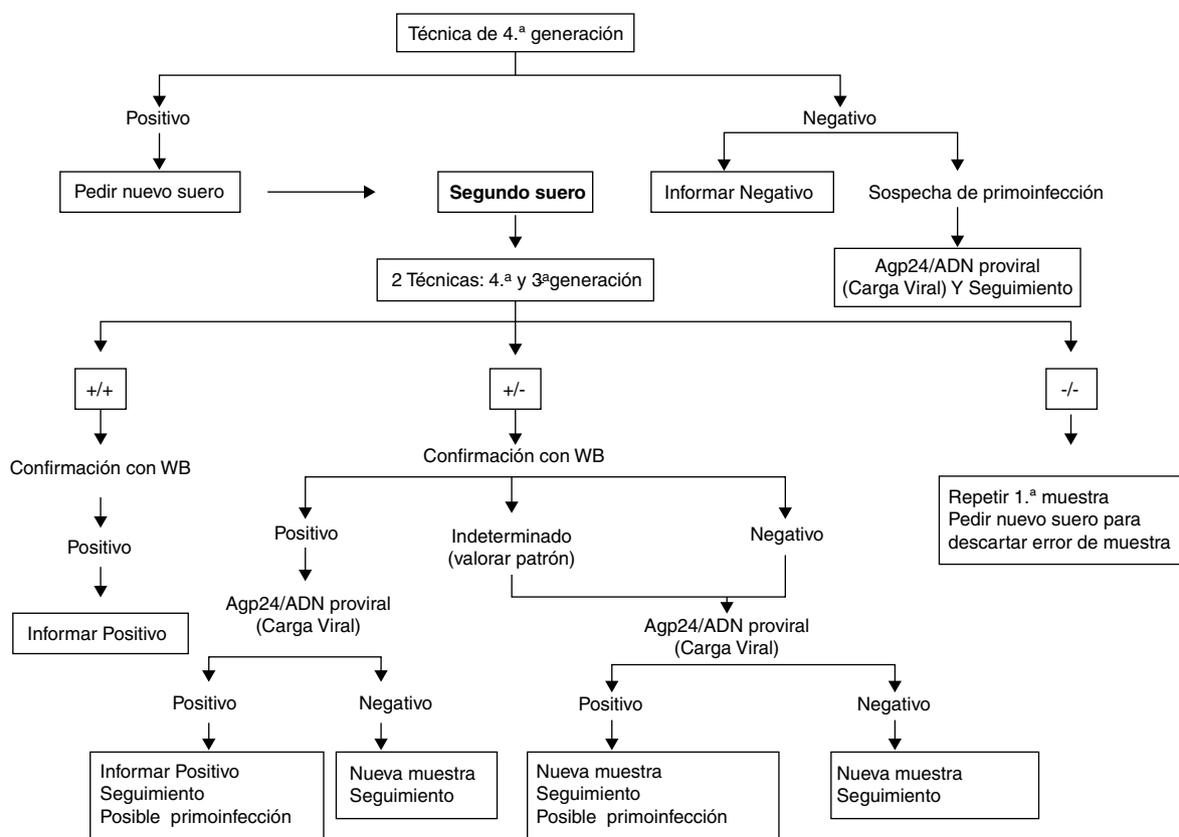


Figura 2. Algoritmo del diagnóstico de infección VIH.

pruebas genotípicas tienen en general más valor para detectar resistencia (detección de una determinada mutación), que para predecir sensibilidad (ausencia de todas las posibles causas de resistencia). Para la elaboración de los perfiles de resistencia de cada fármaco se han utilizado diferentes abordajes, como analizar los virus aislados de personas en los que el fenotipo a un fármaco concreto era resistente, caracterizando en estas cepas las mutaciones que aparecen en su genoma, y más recientemente, los modelos de predicción basados en la respuesta virológica, que relacionan el perfil de mutaciones con la eficacia de un fármaco en un régimen TARGA. De este modo, ante un fracaso a una combinación de fármacos, se puede estudiar el genotipo y deducir que fármaco es causante del fracaso. En la tabla 2 se recogen las ventajas e inconvenientes de los métodos genotípicos y fenotípicos para la determinación de resistencias a los antirretrovirales.

### Ensayos fenotípicos

Los métodos fenotípicos miden la concentración de fármaco necesario para inhibir la replicación viral en cultivo celular. Los

resultados se expresan generalmente en forma de cambios en la  $IC_{50}$  (*Fold Change* -FC-), comparando con una cepa control. La interpretación del valor de FC es diferente dependiendo del fármaco implicado. Los métodos de sensibilidad del virus en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) han sido desplazados en la actualidad por otros ensayos basados en modelos de virus recombinantes. En los primeros se aísla el virus del paciente y se cultiva con CMSP añadiendo diluciones seriadas del fármaco. La susceptibilidad relativa del virus a un fármaco determinado se establece en base a la menor concentración del fármaco capaz de suprimir la replicación viral. Esta técnica presenta serios inconvenientes por su gran laboriosidad, y porque son métodos caros, lentos y que no están al alcance de cualquier laboratorio de diagnóstico clínico. Para eliminar alguno de estos inconvenientes se diseñaron los métodos basados en el empleo de virus recombinantes que consiguen una mayor rapidez y reproducibilidad en los resultados, aunque siguen sin estar disponibles en los laboratorios de diagnóstico. Consisten en la obtención de la secuencia de los genes de RT y PR del plasma de un paciente por medio de RT-PCR y su introducción dentro de un sistema ya estandarizado para la producción de un

Tabla 1  
Estudios que valoraron la utilidad de los estudios de resistencia.

Estudio	Diseño	Duración	N	$\Delta CV$ VIH ( $\log_{10}$ copias/mL)	p	%pacientes CV<400 copias/mL	p
VIRADAPT	GT/STD	6 meses	108	-1,15 vs -0,67	0,05	32 vs 14	0,067
GART	GT/STD	3 meses	153	-0,94 vs -0,47	0,003	34 vs 22	0,067
VIRA3001	FT/STD	4 meses	274	-1,23 vs -0,87	0,004	45 vs 34	0,09
KAISER	FT/STD	4 meses	115	-0,25 vs -0,4	0,05	-	-
NARVAL	GT/FT/STD	3 meses	541	-	-	41 vs 33 vs 34	0,249
ARGENTA	GT/STD	3 y 6 meses	174	-	-	27 vs 12/ 21 vs 17	0,02/ ns
CTG575	FT/STD	6 meses	238	-	-	48 vs 48	-
HAVANA	GT/STD	6 meses	274	-1,1 vs -0,8	ns	57 vs 42	0,01

FT: fenotipo; GT: genotipo; STD: estándar de tratamiento.

**Tabla 2**

Ventajas e inconvenientes de los ensayos genotípicos y fenotípicos para la determinación de resistencias a los antirretrovirales.

Ventajas	Inconvenientes
<b>Genotipo</b>	
Rapidez	Detección indirecta de la resistencia
Dificultad técnica media, realizable en laboratorios hospitalarios	Desconocimiento del efecto de las resistencias cruzadas
Menor coste económico	Puede no existir correlación con el análisis fenotípico
La mutación precede a la resistencia fenotípica	Carencia de sensibilidad para las variantes menores (< 20%)
	Requieren la interpretación por un experto
	No son válidos para nuevas drogas hasta que se diseñan los algoritmos de interpretación y se validan clínicamente
<b>Fenotipo</b>	
Medida directa de la sensibilidad a los distintos antirretrovirales	No puede realizarse con cargas virales bajas
Proporciona información acerca de las resistencias cruzadas	No detecta subpoblaciones virales que constituyan menos del 10-20% de la población total
Reflejan el efecto de todas las mutaciones presentes, incluso aquellas que aún no han sido descritas	No aporta sensibilidad a combinaciones de fármacos
Los resultados son fáciles de interpretar	Falta de estandarización en los valores de IC <sub>50</sub> de cada fármaco
	Disponible únicamente en laboratorios comerciales por su elevada complejidad
	Elevado coste y técnica compleja
	Posible selección de variantes víricas mejor adaptadas al cultivo celular

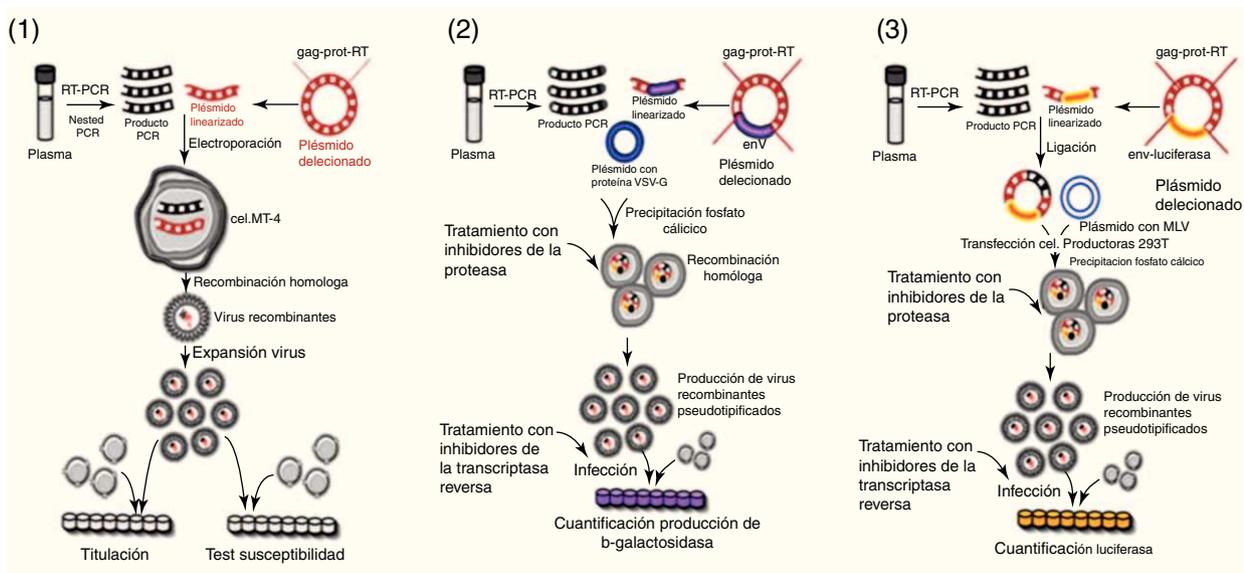
VIH recombinante capaz de infectar una línea celular, incluyendo un procedimiento que facilita la lectura de los resultados. Actualmente hay tres compañías principales que ofrecen la realización de estas pruebas fenotípicas: Antivirogram® (Virco), PhenoSense® (Virologic) y Phenoscript® (VIRAlliance). Las características de estos ensayos se muestran en la figura 3. La interpretación de los resultados de estos ensayos, aunque más intuitiva y sencilla, no está exenta de complicaciones, ya que analizan la sensibilidad fármaco a fármaco, y en la vida real las combinaciones pueden suponer un comportamiento diferente del meramente aditivo.

### Ensayos genotípicos

En ellos se estudian los cambios en el gen de la transcriptasa inversa, proteasa, o integrasa, que generan la resistencia frente a

análogos y no análogos de los nucleósidos/ótidos, frente a los inhibidores de la proteasa y frente a los inhibidores de la integrasa, respectivamente, que se conocen como mutaciones de resistencia. También se pueden determinar mutaciones en HR1 y HR2 para estudiar la resistencia frente a los inhibidores de la fusión, aunque estos fármacos (enfuvirtide) se utilizan ya muy poco en terapia antirretroviral.

La técnica más empleada para la detección de mutaciones de resistencia es la secuenciación poblacional del genoma que codifica las enzimas transcriptasa inversa, proteasa o integrasa. Antes de la secuenciación es necesario extraer el ácido nucleico del plasma del paciente, transcribirlo en ADN (retrotranscripción) y hacer al menos una reacción de amplificación (PCR). Una vez realizada la reacción de secuenciación, el procedimiento de lectura se encuentra automatizado mediante electroforesis acoplada a la detección de



**Figura 3.** Ensayos de virus recombinantes para la determinación fenotípica de la resistencia a los antirretrovirales.

En el método Antivirogram® (Virco) (1) los virus recombinantes se preparan mediante transfección de células MT-4 con el producto amplificado PR-RT y con un plásmido que contiene el genoma completo del VIH salvo la región gag-pro-RT. La CI<sub>50</sub> del virus recombinante se determina en cultivos, midiendo la viabilidad de células MT4 infectadas con el virus recombinante en presencia de diluciones de cada antirretroviral. El método Phenosense (Viralliance) (2), combina aspectos de los otros dos métodos: un proceso de recombinación homóloga, como en el Antivirogram, con un sólo ciclo de replicación viral, como en el Phenosense. Las células diana (P4) contienen el gen de la β-galactosidasa controlado por LTR de HIV de modo que cuando se acumulan suficientes productos del gen TAT en la célula infectada, se expresa el gen de la β-galactosidasa y su producto se puede medir mediante colorimetría o fluorimetría. El método Phenosense (ViroLogic) (3), a diferencia del Antivirogram, es un ensayo de un solo ciclo de replicación viral, lo que reduce el tiempo para los resultados. Utiliza un proceso de ligación, más que de recombinación homóloga, para introducir el fragmento amplificado mediante RT-PCR en el genoma de una partícula de VIH en la que el gen *env* ha sido sustituido por un gen productor de luciferasa. En un ciclo de replicación este virus es capaz de producir todas las proteínas de VIH a excepción de las de envoltura, y en su lugar, se expresa el gen de la luciferasa. La CI<sub>50</sub> del virus recombinante se determina cuantificando la expresión del gen de la luciferasa en cultivos de célula infectadas con el virus recombinante en presencia de antirretrovirales.

**Tabla 3**  
Principales guías de tratamiento antirretroviral.

Guía	Acceso
IAS ( <i>International AIDS Society</i> )	<a href="http://www.iasusa.org/guidelines/index.html">www.iasusa.org/guidelines/index.html</a>
DHHS ( <i>U.S. Department of Health Human Services</i> )	<a href="http://www.aidsinfo.nih.gov/guidelines/">http://www.aidsinfo.nih.gov/guidelines/</a>
CDC ( <i>Centre for Disease Control</i> )	<a href="http://www.cdc.gov/hiv/">http://www.cdc.gov/hiv/</a>
EACS ( <i>European AIDS Society</i> )	<a href="http://www.europeanaidscinicalociety.org/guidelines.asp">http://www.europeanaidscinicalociety.org/guidelines.asp</a>
BHIVA ( <i>British HIV Association</i> )	<a href="http://www.bhiva.org/ClinicalGuidelines.aspx">http://www.bhiva.org/ClinicalGuidelines.aspx</a>
GESIDA-PNS (Grupo SEIMC de Estudio de SIDA-Plan Nacional sobre el SIDA)	<a href="http://www.gesida.seimc.org/pcientifica/dccconsensos.asp?apnv0=pcientifica&amp;apnvA=dccconsensosyrc&amp;appag=dccconsensos.txt.htm">www.gesida.seimc.org/pcientifica/dccconsensos.asp?apnv0=pcientifica&amp;apnvA=dccconsensosyrc&amp;appag=dccconsensos.txt.htm</a>

dideoxi-nucleótidos (terminadores de cadena) fluorescentes. Tras la obtención de la secuencia es necesario un análisis informático para comparar las secuencias obtenidas con una cepa de referencia para establecer las mutaciones encontradas relacionadas con resistencia a antirretrovirales. Algunas de las compañías que han desarrollado reactivos y equipos de secuenciación automática para esta aplicación son TruGene® HIV-1 Genotyping Test (Siemens) y ViroSeq® HIV-1 Genotyping System (Abbott Diagnostics). El primero emplea la secuenciación bidireccional y la electroforesis en gel, mientras que el segundo emplea el método unidireccional y la electroforesis capilar. Ambos sistemas ofrecen un *software* para la edición de las secuencias y un algoritmo propio de interpretación.

Las técnicas de secuenciación, comerciales o “caseras” aseguran un 98-100% de éxito en la amplificación en muestras con una carga viral superior a 500-1.000 copias/ml, sin embargo, con las adecuadas modificaciones es posible amplificar prácticamente cualquier muestra con carga viral detectable<sup>24</sup>. No debemos olvidar, que la secuencia obtenida por estos métodos de secuenciación poblacional es en realidad la secuencia promedio de todas las variantes presentes en la muestra original, siendo difícil detectar mutaciones que supongan menos del 10-20% del total<sup>25</sup>. Esto explica por qué los métodos que utilizamos predicen el fracaso de un fármaco pero no aseguran el éxito, ya que las mutaciones pueden encontrarse por debajo de estos niveles (variantes minoritarias), y pueden ser seleccionadas cuando se emplea el fármaco al que confiere resistencia. Para asegurar la detección de las variantes que representan menos del 20%, hemos de recurrir a técnicas especiales: clonación de los productos de amplificación, PCR mediante diluciones límite o PCR-alelo específica a tiempo real, que no son aplicables hoy por hoy a la rutina del laboratorio de diagnóstico clínico. Recientemente se han introducido técnicas que permiten la secuenciación masiva de genomas únicos. Existen, en este momento, cuatro plataformas comerciales de secuenciación masiva, aunque la tecnología 454-UDS (Roche Diagnostics), es la que por el momento ofrece resultados en el campo de las mutaciones de resistencia a antirretrovirales. Además de una compleja metodología que aun no está al alcance de los laboratorios de diagnóstico, una herramienta imprescindible para poder usar estas técnicas son los sistemas informáticos con capacidad para almacenar y manejar enormes masas de datos, y programas diseñados específicamente para leer y filtrar miles de secuencias, ensamblarlas, anotarlas ó compararlas con bases de datos externas. No obstante, si se consiguen superar estas dificultades, estas técnicas se presentan como una alternativa, de gran valor, a las técnicas convencionales.

#### Interpretación de las mutaciones de resistencia

La interpretación de las mutaciones de resistencia es compleja y constituye uno de los pasos de mayor importancia para emitir una información correcta. Aunque existen mutaciones concretas que determinan perfiles de resistencia muy específicos y su significado es muy claro, en especial para los fármacos de baja barrera genética,

en otras ocasiones una determinada combinación de mutaciones es difícil de interpretar debido al efecto aditivo o incluso revertiente de algunas mutaciones sobre otras. Además, para hacer una correcta interpretación del genotipo de resistencias es imprescindible una continua actualización por la aparición de nuevos patrones de resistencia y por la incorporación de nuevos fármacos. Por todos estos motivos se han diseñado distintos algoritmos de interpretación que facilitan dicha labor. Estos algoritmos están disponibles en páginas web y, por lo general, son de acceso gratuito. Su manejo es sencillo ya que sólo hay que editar la secuencia obtenida, en formato fasta o txt, en dicha página web, que de forma automática nos devuelve un informe de interpretación de los niveles de resistencia a todos los antirretrovirales. Entre los principales algoritmos destacan: la página web de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>), la página de la Sociedad Internacional de SIDA de EE.UU. ([www.iasusa.org](http://www.iasusa.org)), la página de la ANRS francesa ([www.hivfrenchresistance.org](http://www.hivfrenchresistance.org)), el algoritmo de la Red de Investigación en SIDA –RIS– ([www.retic-ris.net](http://www.retic-ris.net)), el algoritmo Geno2pheno ([www.geno2pheno.org](http://www.geno2pheno.org)), o sistemas de interpretación como el Fenotipo Virtual (VircoType). Estas guías recogen, además de las resistencias clásicas frente a análogos y no análogos de la RT e inhibidores de la proteasa, las nuevas mutaciones descritas frente a los inhibidores de la integrasa. Es importante alertar, que no todos los sistemas de interpretación aportan la misma calidad de interpretación. En general, para la elección del sistema de interpretación que vayamos a utilizar debemos valorar, entre otros, la fecha de la última actualización, la metodología que se ha empleado para derivar las reglas de interpretación, el número de pacientes que se incluyen para la elaboración de la/s regla/s de interpretación, si se adscribe distinto peso a distintas mutaciones, si la prevalencia de mutaciones en la población analizada es similar a la prevalencia local, si se tienen en cuenta mutaciones con efecto beneficioso, si existen datos clínicos que avalen que ese algoritmo es capaz de predecir la eficacia virológica, y si se tienen en cuenta reglas de interpretación específica para los subtipos no-B. Además, cuando realizamos la interpretación de un perfil de resistencias también hemos de tener en cuenta la historia previa de tratamiento antirretroviral del paciente y, si los hubiese, los estudios previos que se le hayan practicado, sumando para su interpretación todo su histórico de mutaciones/secuencias (genotipo acumulado). Esta estrategia ha demostrado mejorar la interpretación del genotipo de resistencias, consiguiendo mayores niveles de eficacia en el régimen elegido si este se basa en el genotipo acumulado en vez de en el último genotipo realizado<sup>26</sup>.

#### Indicaciones para la realización de los estudios de resistencia

Actualmente existen numerosas guías nacionales e internacionales que describen las circunstancias en las que se aconseja un estudio de resistencia (tabla 3). En general, dichas guías coinciden en la recomendación de realizar el estudio de resistencia antes de comenzar el tratamiento antirretroviral, sea una infección reciente o crónica, tras el fracaso terapéutico, en embarazo o tras una exposición accidental al caso fuente si no lo posee. No

**Tabla 4**  
Ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos disponibles para determinación del tropismo viral.

Metodología	Ventajas	Inconvenientes
ESTA (Enhanced Sensitivity Trophile Assay)	Sensibilidad para variantes DM/X4 (0,3%) Dispone de validación clínica en ensayos clínicos (MOTIVATE, MERIT)	Limitaciones logísticas (envío EE.UU.) Caro, Lento, Exige viremia $\geq 1000$ cop/mL
Genotipo V3 plasma (secuenciación poblacional)	Rápido, práctico y económico Ampliamente disponible en laboratorios Sensibilidad Clínica	Menor sensibilidad analítica para DM/X4
Genotipo V3 en ADN proviral (CMSP/sangre total)	Posibilidad de amplificar muestras con viremia $<50$ cop/ml (única alternativa en muchas situaciones clínicas) Práctico	Falta de estandarización y validación clínica Sesgos en la representación de secuencias plasmáticas en células
Genotipo V3 (UltraDeepSequencing)	Alta sensibilidad en la detección de variantes X4 Permite la cuantificación de variantes X4 Validado en estudios clínicos	Muy Costoso y laborioso Dificultad en el manejo y la interpretación de los resultados No accesible actualmente para laboratorios clínicos
Ensayo MT-2	Barato	Requiere el cultivo viral Sensibilidad por determinar

se recomienda tras suspensión del tratamiento por la reversión de la mayoría de las mutaciones que no se detectarían al ser variantes minoritarias.

### Determinación del tropismo viral

Los antagonistas de los receptores de quimiocinas son una nueva familia de fármacos que ha pasado a formar parte del arsenal terapéutico para el tratamiento de la infección por VIH. La actividad antiviral de los antagonistas de CCR5 está limitada a variantes R5-trópicas<sup>27</sup> y la detección de variantes X4-trópicas en pacientes que inician tratamiento con antagonistas de CCR5 se ha asociado con el fracaso virológico al tratamiento con estos fármacos<sup>28</sup>. Por lo tanto, antes de recomendar el inicio de un tratamiento con antagonistas de CCR5, se requiere la realización de un estudio de tropismo del VIH por los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4. El tropismo viral por los receptores de quimiocinas puede ser determinado mediante métodos fenotípicos y genotípicos<sup>29</sup>. A continuación se describen en detalle las características metodológicas así como sus principales ventajas e inconvenientes para su utilización en la práctica clínica, que se muestran en la [tabla 4](#).

#### Métodos fenotípicos

Los ensayos fenotípicos para la determinación de tropismo se basan en la generación de virus recombinantes. En este tipo de ensayo el gen de la envuelta es amplificado mediante PCR (RT-PCR) a partir del plasma del paciente y mediante técnicas de clonaje o recombinación genética se generan virus quiméricos o pseudotipos que portan la envuelta del paciente. Estos virus son utilizados para infectar líneas celulares que expresan el receptor CD4 y uno de los dos correceptores principales del VIH, CCR5 o CXCR4. De esta manera, se define el tropismo viral conferido por la envuelta del paciente estudiado a partir del comportamiento del virus recombinante. Trofile™ (*Monogram Biosciences, San Francisco, California, USA*) es el ensayo fenotípico de mayor difusión. Se incluye en el grupo de métodos basados en la generación de virus recombinantes de ciclo único<sup>30</sup>. Hasta el momento, es el único método validado y aprobado en EE.UU. por la FDA para la determinación del tropismo viral en muestras de pacientes candidatos a tratamiento con maraviroc, el único anti-CCR5 aprobado. La característica principal de este y otros métodos similares es el conseguir amplificar la envuelta completa del VIH del paciente. Este aspecto es relevante ya que aunque la región V3 contiene los principales determinantes del tropismo viral existen otras regiones implicadas (V1, V2, C4). Los ensayos clínicos MERIT y MOTIVATE han revelado limitaciones de la

versión inicial de Trofile™ para detectar poblaciones minoritarias que se correlacionaron con fracaso terapéutico a maraviroc. Para solventar esta limitación la compañía Monogram ha desarrollado una versión mejorada del sistema en la que se aumenta el nivel de sensibilidad para detectar variantes minoritarias X4 o R5/X4 en torno al 0,3%<sup>31</sup>. En la actualidad, esta versión ESTA-Trofile™, es la comercialmente disponible y ha sido validada retrospectivamente en los ensayos MERIT. ESTA-Trofile™ reclasificó como DM un 14,7% de los pacientes identificados originalmente como R5 en el momento basal por Trofile™. Sin embargo, en un análisis detallado de los datos se observa que a pesar de su mayor sensibilidad para detectar variantes minoritarias X4-trópicas, ESTA-Trofile™ no mejora la capacidad del ensayo para discriminar entre pacientes respondedores y no respondedores a maraviroc, ya que aproximadamente un 43% de los pacientes reclasificados como DM habían respondido (ARN-VIH  $< 50$  cop/mL en semana 48) a la terapia con maraviroc a pesar de la presencia de variantes X4-trópicas<sup>32</sup>.

En España, se ha desarrollado el ensayo *TropiTest* (*Instituto de Salud Carlos III-Fundación FIPSE*). La principal ventaja de este sistema es que los virus recombinantes que se generan son virus de ciclo múltiple, lo que permite bajar el umbral de sensibilidad para la detección de poblaciones minoritarias al menos al 1%<sup>33</sup>. Otra ventaja que es compartida con el método de Trofile™ es que amplifica el gen completo de la envuelta. Este test ha sido validado con ambas versiones de Trofile™ mostrando una excelente correlación con la versión Trofile™ES. Otros ensayos fenotípicos son: *PhenoX-R* (*InPheno AG, Basel, Switzerland*), *Virco® type HIV-1* (*Virco BVBA, Mechelen, Belgium*), *HIV-1 Phenoscript Env™* (*VIAlliance, Paris; France*), y *Toulouse Tropism Test* (*Universidad de Toulouse*). Las principales características de los ensayos fenotípicos para determinación del tropismo se pueden consultar en la [tabla 5](#).

#### Métodos genotípicos

Los métodos genotípicos se presentan como una alternativa más económica, rápida y factible de desarrollar localmente en cualquier laboratorio especializado de VIH que cuente con tecnología para realizar la determinación de resistencias a antirretrovirales. Desde principios de los años noventa, se han descrito y desarrollado diferentes reglas y algoritmos de correlación genotipo-tropismo basados fundamentalmente en las características de la secuencia de aminoácidos de la región V3 de la envuelta viral<sup>34</sup>. Inicialmente se propusieron reglas sencillas como la "regla 11/25 o la regla de la carga neta", que se caracterizan por presentar una gran especificidad para la clasificación de variantes X4-trópicas, aunque baja sensibilidad<sup>35,36</sup>. Posteriormente, el estudio de la variabilidad

**Tabla 5**  
Principales métodos fenotípicos basados en generación de virus recombinantes para determinación del tropismo viral.

	VIRalliance Phenoscript	Xtrack <sup>c</sup> /PhenX-R In Pheno AG	Virco NH2-V4 gp120	Monogram Biosciences TrofileES*	Univ Toulouse Toulouse Tropism Test (TTT)	ISCIH-FISPE Tropitest
Amplicón	V1-V3 gp120 (900 pb)	pNL4-3 defectivo env	pHXB2D-ΔNH2-V4-eGFP	pCAX-PXMX (expresión env) + RTV1.F-lucP.CNDOΔU3	pNL43Δenv-Luc2 vector	pNL4-3-lacZ/env-
Generación del vector	Recombinación homóloga	Clonaje	Recombinación	Clonaje	Recombinación homóloga	Clonaje
Células Diana	U373-CD4-CCR5 U373-CD4-CXCR4	CXCR4 CCR5/CXCR4	U87.CD4.CCR5 U87.CD4.CXCR4	U87.CD4.CCR5 U87.CD4.CXCR4	U87.CD4.CCR5 U87.CD4.CXCR4	U87/Ghost/PBMc CD4.CCR5
Gen marcador	β-galactosidasa	β-galactosidasa	GFP	Luciferasa	Luciferasa	Luciferasa
Replicación	Ciclo múltiple	Ciclo único	Ciclo múltiple	Ciclo único	Ciclo múltiple	Ciclo múltiple
Sensibilidad	5-10%	1%	5-10%	0,3-1%	0,5%	1%

natural en secuencias de V3 y su asociación con los fenotipos R5- o X4-tropicos, ha permitido la identificación de nuevos residuos y patrones de aminoácidos en la región V3 relacionados con el tropismo viral. Con los datos obtenidos y a través de la utilización de diferentes métodos estadísticos (*support vector machines-SVM*, *position specific scoring matrices-PSSM*) se han diseñado sofisticados algoritmos de interpretación que permiten predecir el uso del coreceptor del VIH basándose en la secuencia genética de la región V3 de un determinado aislado viral. Algunos de ellos se encuentran disponibles en páginas *web* de libre acceso como son *WetCat*, *geno2pheno<sub>coreceptor</sub>*, y *WebPSSM*. Diversos estudios han evaluado también la capacidad de predecir el tropismo viral combinando la información aportada por varios algoritmos, e incluso variables clínicas relacionadas con la infección por VIH. Estos métodos han conseguido mejorar la sensibilidad para detectar cepas X4, sin una pérdida significativa de especificidad<sup>37,38</sup>.

El algoritmo de interpretación de más amplia difusión es *Geno2pheno<sub>coreceptor</sub>*. Se ha desarrollado conjuntamente entre la Universidad de Colonia y el Instituto Max-Planck de Alemania<sup>39</sup>. El método estadístico que utiliza para hacer sus predicciones es *SVM (Support Vector Machine)*. *Geno2pheno* puede realizar las predicciones tanto a partir de la secuencia FASTA de nucleótidos o de aminoácidos de la región V3. La base de datos en la que basa *geno2pheno* sus predicciones consiste en un total de 1100 secuencias de V3 de 332 pacientes: 769 secuencias de V3 que se corresponden con un fenotipo R5, 210 con un fenotipo X4 y 131 secuencias con fenotipo R5X4, principalmente obtenidas de la base de datos de Los Álamos. La mayoría de estas secuencias son subtipo B, aunque también incluye algunas secuencias de otros subtipos genéticos. El servidor permite seleccionar en cada predicción el grado de sensibilidad para detectar variantes X4, seleccionando el porcentaje de FPR (*False Positive Rate*) en cada predicción. La última versión de *geno2pheno* oferta la posibilidad de introducir datos clínicos adicionales como la carga viral, número de CD4 y la presencia o ausencia de la delección de 32 pares de bases

para el receptor CCR5, con el fin de mejorar las predicciones. La principal ventaja de este método es que se muestra en constante evolución y se realizan actualizaciones periódicas en las bases de datos.

Al igual que para la determinación de resistencias, las nuevas plataformas de secuenciación masiva permiten superar las limitaciones de las técnicas convencionales de secuenciación poblacional, mediante la generación simultánea de centenares de secuencias clonales de virus<sup>40,41</sup>. Actualmente, 454 (454 Life Sciences/Roche Diagnostics) es la plataforma de secuenciación masiva mejor situada para el estudio del tropismo del VIH porque genera secuencias de 300-500 pares de bases y ello permite secuenciar la región V3 entera en un solo amplicon. Así, 454 permite detectar virus X4 presentes en < 1% de la población viral<sup>42</sup>. Aunque los estudios realizados con 454 han demostrado una superioridad técnica frente a los métodos convencionales, la realidad es que esta tecnología todavía no está disponible para el diagnóstico clínico rutinario. Es una tecnología cara, poco automatizada, requiere un conocimiento técnico muy especializado, y precisa un análisis bioinformático intensivo. Estas limitaciones técnicas e industriales se están resolviendo rápidamente mediante nuevas versiones de la tecnología (secuenciador 454 Junior) y mediante el desarrollo de herramientas de interpretación parcialmente automatizadas como *Geno2Pheno-454* (<http://g2p-454.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>).

La validación de los ensayos genotípicos para uso clínico requiere la demostración de su capacidad para identificar pacientes respondedores y no respondedores a un tratamiento con antagonistas de CCR5 más que demostrar una perfecta correlación con el ensayo fenotípico de Trofile<sup>TM</sup>. El re-análisis retrospectivo de los ensayos MOTIVATE<sup>43</sup> ha demostrado que las herramientas genotípicas y el ensayo de Trofile<sup>TM</sup> son comparables en la predicción de respuesta a maraviroc a pesar de que la sensibilidad de las herramientas genotípicas utilizadas *geno2pheno-5%* y *PSSM* para detectar variantes X4-tropicas fue del 63 y 59%, res-

**Tabla 6**  
Ventajas e inconvenientes de los ensayos genotípicos y fenotípicos para la determinación del tropismo viral.

Limitaciones	Fenotipo	Genotipo
Técnicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>La transcripción inversa <i>in vitro</i> (síntesis de una doble hebra de ADN a partir de ARN) tiene una eficiencia no superior al 10%</li> <li>La eficiencia del proceso de generación del plásmido en el que se inserta la envuelta del paciente es variable. Las técnicas de clonaje son más eficaces que las de recombinación homóloga, y por tanto más sensibles</li> <li>La generación de virus de ciclo múltiple aumenta la sensibilidad frente a los sistemas de ciclo único, ya que las secuencias minoritarias se amplifican "biológicamente" en los ciclos de infección-reinfección y pueden ser detectadas con mayor eficacia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La transcripción inversa <i>in vitro</i> (síntesis de una doble hebra de ADN a partir de ARN) tiene una eficiencia no superior al 10%</li> <li>"Limitada" sensibilidad de la secuenciación poblacional para detectar variantes por debajo del 10-20%</li> <li>Amplificación limitada a la región V3, sin tener en cuenta los determinantes contenidos en V1, V2 y C4</li> </ul>
De interpretación	<ul style="list-style-type: none"> <li>Determinación del umbral "clínico" que predice el éxito o el fracaso al tratamiento con antagonistas de CCR5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los sistemas de interpretación del tropismo viral están basados en datos pareados genotipo/fenotipo con un número relativamente bajo de secuencias y con escaso número de secuencias de subtipos no-B</li> </ul>

pectivamente, comparado con Trofile™. De la misma manera el re-análisis retrospectivo del ensayo MERIT<sup>44</sup> logró demostrar la capacidad de la herramienta geno2pheno-5,75% para identificar pacientes respondedores y no-respondedores a maraviroc de forma similar a ESTA-Trofile™ a pesar de que de nuevo la sensibilidad de geno2pheno para detectar variantes X4-trópicas fue del 55% comparado con ESTA-Trofile™. Recientemente, se han presentado estudios prospectivos en diferentes cohortes europeas en los que se ha valorado la respuesta a maraviroc en pacientes en los que su uso terapéutico fue basado en la determinación genotípica del tropismo viral. En general, los resultados derivados de estos estudios señalan tasas de respuesta a maraviroc superiores al 85% cuando los aislados de los pacientes eran clasificados genotípicamente como R5-trópicos<sup>45,46</sup>.

Las limitaciones de los ensayos fenotípicos y genotípicos para la determinación del tropismo viral se presentan en la tabla 6. Los datos actuales ponen de manifiesto la viabilidad de la utilización de determinadas herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral en la práctica clínica<sup>47</sup>. Por todo lo expuesto, diversas guías de manejo de la infección por VIH, como las españolas (<http://www.gesida.seimc.org>)<sup>16</sup>, europeas ([www.europehivresistance.org](http://www.europehivresistance.org)) y británica (<http://www.bhiva.org/Tropism.aspx>)<sup>48</sup>, incluyen entre sus recomendaciones la posibilidad de determinar el tropismo del VIH mediante métodos genotípicos para guiar el uso terapéutico de los antagonistas de CCR5.

## Bibliografía

- Buttó S, Suligoi B, Fanales-Belasio E, Raimondo M. Laboratory diagnostics for HIV infection. *Ann Ist Super Sanità.* 2010;46:24–33.
- Tebourski F, Slim A, Elgaaied A. The significance of combining World Health Organization and Center for Disease Control criteria to resolve indeterminate human immunodeficiency virus type-1 Western blot results. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;48:59–61.
- Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Butto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanità.* 2010;46:5–14.
- Weber B. Screening of HIV infection: role of molecular and immunological assays. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006;6:399–411.
- Nazida F. Laboratory test for detection of human Immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995;2:637–45.
- Butto S, Raimondo M, Fanales-Belasio E, Suligoi B. Suggest strategies for the laboratory diagnosis of HIV infection in Italy. *Ann Ist Super Sanità.* 2010;46:34–41.
- Ekwueme DU, Pinkerton SD, Holtgrave DR, Branson BM. Cost comparison of three HIV counseling and testing technologies. *Am J Prev Med.* 2003;25:112–21.
- Casey JM, Kim Y, Andersen PR. Human T-cell lymphotropic virus type III: immunologic characterization and primary structure analysis of the major internal protein p24. *J Virology.* 1985;55:417–23.
- Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal BD, O'Brien TR, Weiblen BJ, et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA.* 1998;280:42–8.
- Black V, von Mollendorf CE, Moyes JA, Scott LE, Puren A, Stevens WS. Poor sensitivity of field rapid HIV testing: implications for mother-to-child transmission programme. *BJOG.* 2009;116:1805–8.
- Gray RH, Makumbi F, Serwada D, Lutalo T, Nalugoda F, Opendi P, et al. Limitations of rapid HIV-1 test during screening for trials in Uganda: diagnosis test accuracy study. *BMJ.* 2007;335–88.
- O'Gorman MR, Weber D, Landis SE, Schoenbach VJ, Mittal M, Folds JD. Interpretive criteria of the Western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Pathol Lab Med.* 1991;115:26–30.
- The Consortium for Retrovirus Serology Standardization. Serological diagnosis of human immunodeficiency virus infection by Western blot testing. *JAMA.* 1988;260:674–9.
- Healy DS, Maskill TS, Howard TS, Armstrong VA, Bolton WV, Cooper GJ, et al. HIV-1 Western blot: development and assessment of testing to resolve indeterminate reactivity. *AIDS.* 1992;6:629–33.
- Suligoi B, Massi M, Galli C, Sciadra M, Di Sora F, Pezzotti P, et al. Identifying recent HIV infections using the avidity index and automated enzyme immunoassay. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003;32:424–8.
- Recomendaciones de Gesida/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antiretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (actualización enero 2010). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28:362.e1–91. Disponible en: <http://www.gesida.seimc.org/publica/fuentes/DcyRc/gesidadcyrc2010.DocconsensoTARGESIDA-PNS-verpc.pdf>.
- Thompson MA, Aberg JA, Cahn P, Montaner JS, Rizzardini G, Telenti A, et al. International AIDS Society-USA. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA.* 2010;304:321–33.
- Gupta RK, Hill A, Sawyer AW, Cozzi-Lepri A, von Wyl V, Yerly S, et al. Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:409–17.
- Reekie J, Mocroft A, Ledergerber B, Beniowski M, Clotet B, van Lunzen J, et al. EuroSIDA Study Group. History of viral suppression on combination antiretroviral therapy as a predictor of virological failure after a treatment change. *HIV Med.* 2010;11:469–78.
- Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Bazmi H, Mican JM, Polis M, et al. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4531–6.
- de Mendoza C, Holguín A, Soriano V. False positives for HIV using commercial viral load quantification assays. *AIDS.* 1998;12:2076–7.
- Hirsch MS, Günthard HF, Schapiro JM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Mellors JW, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis.* 2008;47:266–85.
- Pillay D, Zambon M. Antiviral drug resistance. *BMJ.* 1998;317:660–2.
- Parra-Ruiz J, Álvarez M, Chueca N, Peña A, Pasquau J, López-Ruz MA, et al. Resistencias genotípicas en pacientes con VIH-1 y grados de viremia persistentemente bajos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27:75–80.
- Paredes R, Lalama CM, Ribaudo HJ, Schackman BR, Shikuma C, Giguere F, et al. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5095 Study Team. Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure. *J Infect Dis.* 2010;201:662–71.
- Álvarez M, García A, Guillot V, Johnson M, Chueca N, Hernández-Quero J, et al. Cumulative Versus Last Genotype: Impact on the Prediction of Antiretroviral Drug-Resistance. 7th European HIV Drug Resistance Workshop; 2009, Mar 25–27; Stockholm, Sweden.
- Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-HIV type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:4721–32.
- Cooper D, Heera J, Goodrich J, Tawadrous M, Saag M, DeJesus E, et al. Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-lamivudine for the treatment of antiretroviral-naïve subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2010;201:803–13.
- Poveda E, Briz V, Quinones-Mateu M, Soriano V. HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. *AIDS.* 2006;20:1359–67.
- Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, et al. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:566–75.
- Trinh L, Han D, Huang W, Wrin T, Larson J, Kiss L, et al. Technical validation of an enhanced sensitivity Trofile HIV coreceptor tropism assay for selecting patients for therapy with entry inhibitors targeting CCR5. *Antiviral Therapy.* 2008;13:A128.
- Alcami J, Sánchez-Palomino S, García J, González N. Utilización de virus recombinantes en tests de sensibilidad a fármacos, detección de anticuerpos neutralizantes y cribado y caracterización de compuestos con actividad antiviral nuevos clones virales recombinantes basados en VIH-1 y su utilización en métodos analíticos. N° PATENTE: 200401116. N° BOPI: 16022007.
- González N, Pérez-Olmeda M, García-Pérez J, Mateos E, Cascajero A, Álvarez A, et al. Evaluation of HIV-1 tropism using a new and sensitive system based on recombinant viruses. XVII international HIV drug resistance workshop, June 10–14, Sitges, Spain 2008 [abstract 109].
- Jensen M, Van't Wout A. Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev.* 2003;19:145–9.
- Briggs D, Tuttle D, Sleasman JW, Goodenow MM. Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS.* 2000;14:2937–9.
- Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, et al. Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasisppecies. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1572–80.
- Chueca N, Garrido C, Álvarez M, Poveda E, de Dios Luna L, Zahonero N, et al. Improvement in the determination of HIV-1 tropism using the V3 gene sequence and a combination of bioinformatic tools. *J Med Virol.* 2009;81:763–7.
- Sánchez V, Robledano C, Lumberras B, Padilla S, Poveda E, Soriano V, et al. A highly sensitive and specific model for predicting HIV-1 tropism in treatment-experienced patients combining V3 loop sequences interpretation and clinical parameters. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 2010 February 16–19; San Francisco, CA, USA [Abstract 543].
- Sing T, Low AJ, Beerwinkel N, Sander O, Cheung PK, Domingues FS, et al. Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antivir Ther.* 2007;12:1097–106.
- Leamon J, Lee W, Tartaro K, Lanza J, Sarkis G, deWinter A, et al. A massively parallel PicoTiterPlate based platform for discrete picoliter-scale polymerase chain reactions. *Electrophoresis.* 2003;24:3769–77.

41. Margulies M, Egholm M, Altman W, Attiya S, Bader J, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437:376–80.
42. Tsibris A, Korber B, Arnaout R, Russ C, Lo C, Leitner T, et al. Quantitative deep sequencing reveals dynamic HIV-1 escape and large population shifts during CCR5 antagonist therapy in vivo. *PLoS ONE*. 2009;4:e5683.
43. Harrigan R, McGovern R, Dong W, Thielen A, Jensen M, Mo T, et al. Screening for HIV tropism using population based V3 genotypic analysis: a retrospective virological outcome analysis using stored plasma screening samples from MOTIVATE-1. 5th IAS 2009, Cape Town [Abstract WELBA101].
44. McGovern R, Dong W, Zhong X, Knapp D, Thielen A, Chapman D, et al. Population-based sequencing of the V3-loop is comparable to the enhanced sensitivity profile assay in predicting virologic response to maraviroc of treatment-naïve patients in the MERIT trial. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2010, San Francisco [Abstract 92].
45. Sierra S, Thielen A, Reuter S, Jensen B, Esser S, Faetkenheuer G, et al. Tropism determination and clinical outcome of 61 patients under maraviroc treatment. 8th European HIV Drug Resistance Workshop, Sorrento, Italy 2010 [Abstract 20].
46. García F, Chueca N, Álvarez M, Codoñer F, Paredes R, Tellez MJ, et al. Low detection of non-CCR5 using strains by ultra deep sequencing does not compromise response to a maraviroc containing regimen. 8th European HIV Drug Resistance Workshop, Sorrento, Italy 2010 [Abstract 22].
47. Poveda E, Alcamí J, Paredes R, Córdoba J, Gutiérrez F, Llibre JM, et al. Genotypic determination of HIV tropism - clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists. *AIDS Rev*. 2010;12:135–48.
48. Geretti AM, Mackie N. Determining HIV-1 tropism in routine clinical practice. Disponible en: <http://www.bhiva.org/documents/Guidelines/Tropism/HIV-1Tropism.doc>.