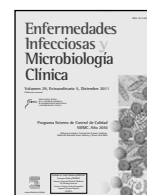




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Tropismo del VIH. Técnicas disponibles y utilidad

Félix Gutiérrez^{a,*}, Juan Carlos Rodríguez^b, Federico García^c y Eva Poveda^d

^aServicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Departamento de Medicina, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España

^bServicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, España

^cServicio de Microbiología, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, España

^dServicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Carlos III, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:
Tropismo VIH
Región V3
Maraviroc
Antagonistas del CCR5

La necesidad de conocer previamente el tropismo constituye un requisito imprescindible para el uso de los fármacos antagonistas de los correceptores CCR5. Un fármaco de esta clase, maraviroc, está ya aprobado para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Aunque en los ensayos de desarrollo de maraviroc, el tropismo se determinó mediante pruebas fenotípicas (Trofile[®]), la realización de éstas es compleja, tiene un coste elevado y su accesibilidad es limitada, lo que dificulta su utilización en la práctica clínica. Los métodos genotípicos basados en el análisis de la tercera región variable (V3) de la envuelta del VIH utilizando algoritmos de interpretación como geno2pheno y PSSM representan una alternativa rápida, barata y accesible en laboratorios diagnósticos para predecir el tropismo viral. En los análisis retrospectivos de los ensayos clínicos de maraviroc, las pruebas genotípicas realizadas mediante técnicas de genotipo convencional (o poblacional) o mediante las nuevas plataformas de secuenciación masiva (pirosecuenciación por 454) fueron capaces de predecir la respuesta virológica al fármaco con una exactitud similar a las pruebas fenotípicas y, actualmente, las recomendaciones españolas y europeas las incluyen como una alternativa aceptable para la determinación del tropismo viral en la práctica clínica.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Methods for determination of HIV tropism and their clinical use

ABSTRACT

Keywords:
HIV tropism
V3 genotyping
Maraviroc
CCR5 antagonists

Determination of HIV-1 tropism is mandatory before using CCR5 antagonists in clinical practice. One drug of this class, maraviroc, has been approved for the treatment of HIV infection. The phenotypic assay, TrofileTM, was clinically validated in the clinical development program of maraviroc and has been widely used to select candidates for maraviroc therapy. Phenotypic tests, however, have the disadvantage of being complex, are costly and time-consuming, and their accessibility is limited, which hampers their routine use in clinical diagnosis. Genotypic assays, based on sequencing the third hypervariable (V3 loop) of the viral gene env, interpreted according to various genotypic bioinformatic tools, such as geno2pheno and PSSM, are faster and cheaper than phenotypic assays, and are also more accessible. In retrospective analyses of the maraviroc pivotal trials, genotypic methods using either conventional ("bulk") or deep-sequencing technology predicted virologic response to maraviroc similarly to phenotypic assays and are now included within several European recommendations to guide the clinical use of CCR5 antagonists.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gutierrez_fel@gva.es (F. Gutiérrez).

Introducción

La terapia antirretroviral convencional incluye el uso de una combinación de 3 fármacos antirretrovirales, generalmente de 2 familias diferentes. Hasta hace poco tiempo sólo se disponía de inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y no análogos de nucleósidos, inhibidores de la proteasa e inhibidores de la fusión. En los últimos años se han desarrollado también fármacos inhibidores de la integrasa y antagonistas del correceptor CCR5. Los antagonistas del correceptor CCR5 tienen una actividad específica frente a variantes virales con afinidad por este receptor, lo que hace necesaria la determinación del tropismo viral en los candidatos a iniciar tratamiento con estos fármacos. Un fármaco de esta clase, maraviroc, está ya disponible para uso clínico.

En este artículo se revisa brevemente el proceso de entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en las células, el mecanismo de acción de los antagonistas del correceptor CCR5, las técnicas disponibles para estudiar el tropismo viral y sus indicaciones clínicas.

Entrada del VIH en las células y mecanismo de acción de los antagonistas del correceptor CCR5

La entrada viral constituye la fase inicial del ciclo vital del VIH. Es un proceso compuesto de varias etapas durante las cuales se produce la interacción entre las proteínas virales de la envuelta del VIH y las moléculas localizadas en la superficie de la célula diana que actúan como receptores celulares, concretamente el receptor CD4 y los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 (fig. 1). La interacción culmina con la fusión de las cubiertas viral y celular, y la liberación de la cápside viral en el citosol¹.

La primera etapa del proceso de entrada se inicia con la unión de la glucoproteína de la envuelta viral a sus receptores celulares. Las glucoproteínas de la envuelta del VIH son sintetizadas a partir de un precursor de 160 kDa (gp160) que es cortado por proteasas celulares en 2 subunidades, gp41 y gp120. La gp41 o subunidad transmembrana se ancla en la membrana viral y su ectodominio se asocia de manera no covalente con la subunidad gp120, o de superficie. En la superficie del virus, los complejos heterodiméricos gp120/gp41 se disponen en trímeros, donde las subunidades gp120 ocupan una po-

sición exterior con sus cuerpos en una orientación divergente que las aleja del eje central en torno del cual, y en su interior, se disponen las subunidades gp41. La subunidad gp120 se compone de 5 regiones variables (V1 a V5) y 5 regiones constantes (C1 a C5).

El complejo trimérico de la envuelta del virus formado por heterodímeros de glucoproteínas gp120 y gp41 es esencial para el reconocimiento y la entrada en la célula diana. La subunidad gp120 es la responsable de la unión a la glucoproteína monomérica de 58 kDa, el receptor CD4 que se expresa en la superficie de los linfocitos T, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células microgliales del sistema nervioso central. Cuando la gp120 se une a la molécula CD4, se produce un cambio conformacional en la envuelta del virus que expone un dominio específico de la gp120 capaz de unirse, según la afinidad de *env*, a uno de los 2 correceptores de quimiocinas, CCR5 o CXCR4, que se encuentran en la superficie de la membrana celular. La región V3 de gp120 se considera el principal determinante, aunque no el único, del uso del correceptor. La secuencia de aminoácidos de V3 determina, en gran medida, el uso preferencial del correceptor CCR5 o CXCR4 por el VIH-1 para entrar en la célula, aunque determinadas mutaciones en la región V2 de gp120 y en gp41 pueden tener también un cierto impacto en el tropismo viral^{2,3}.

Dependiendo del correceptor utilizado para entrar en la célula, los aislados de VIH-1 pueden ser clasificados como CCR5-trópicos (R5), CXCR4-trópicos (X4) o duales/mixtos (DM). El término dual/mixto engloba tanto aislados virales que tienen verdaderamente tropismo dual (partículas virales capaces de utilizar indistintamente ambos correceptores) como las mezclas compuestas de aislados virales que utilizan exclusivamente el correceptor CCR5 y aislados que utilizan el correceptor CXCR4.

La doble interacción de gp120 con el receptor CD4 y con el correceptor de quimiocinas permite que el virus se una con una mayor estabilidad y, a su vez, posibilite un cambio conformacional que expone el dominio N-terminal hidrofóbico de gp41 a la membrana celular y permite la fusión de las membranas viral y celular.

Los antagonistas de los correceptores se unen a la cavidad transmembrana del receptor CCR5, una región distinta al sitio de unión de gp120. Se consideran, por tanto, inhibidores alostéricos más que competitivos. Se cree que ejercen su efecto antiviral por alterar la conformación de las regiones extracelulares con las que interacciona el VIH durante la unión a los correceptores. Como ya se ha mencio-

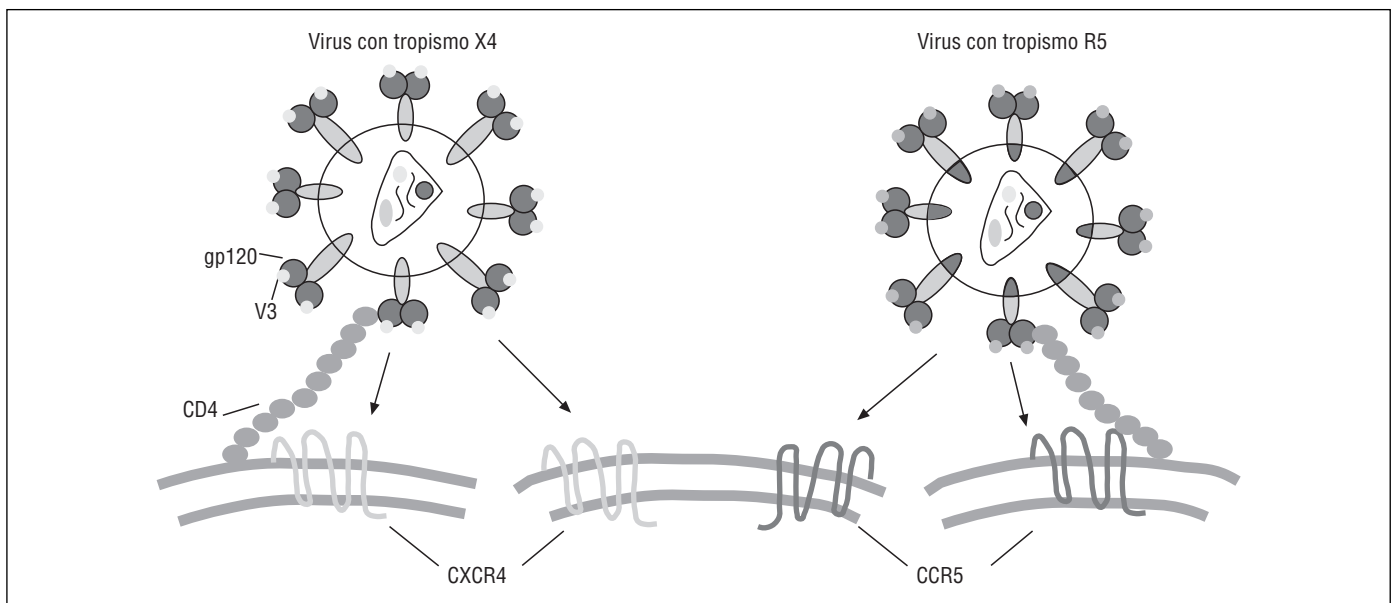


Figura 1. Tropismo viral por los correceptores de quimiocinas y proceso de entrada del VIH en la célula.

Tabla 1
Ventajas e inconvenientes de los métodos fenotípicos y genotípicos

Método	Ventajas	Inconvenientes
Fenotipo (Trofile®ES)	Elevada sensibilidad para variantes DM/X4 Validación en ensayos clínicos de desarrollo de maraviroc (Trofile®)	Accesibilidad limitada Coste elevado Tiempo hasta resultados prolongado Precisa carga viral VIH ≥ 500-1.000 copias/ml No validado en subtipos no B
Genotipado convencional de V3 (secuenciación poblacional)	Accesibilidad Rapidez Bajo coste Validado en reanálisis de ensayos clínicos de desarrollo de maraviroc	Menor sensibilidad analítica para variantes DM/X4 que el fenotipo Precisa carga viral VIH ≥ 500-1.000 copias/ml Menor sensibilidad en subtipos no-B No validado en subtipos no B
Genotipado masivo de V3 (pirosecuenciación)	Elevada sensibilidad para variantes DM/X4 Permite la cuantificación de variantes X4 Validado en reanálisis de ensayos clínicos de maraviroc	Accesibilidad limitada Requiere infraestructura compleja y análisis bioinformático intensivo Precisa carga viral VIH ≥ 500-1.000 copias/ml No validado en subtipos no B

nado, la actividad antiviral de los antagonistas de CCR5 está limitada a variantes R5-trópicas; por tanto, es imprescindible conocer previamente el tropismo viral para usar estos fármacos.

Técnicas disponibles para determinar el tropismo del VIH

El tropismo viral por los receptores de quimiocinas se puede determinar mediante métodos fenotípicos y genotípicos. Las ventajas e inconvenientes de estos métodos se resumen en la tabla 1 y se describen en los apartados siguientes.

Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos se basan en la generación de virus recombinantes. En estos ensayos el gen de la envuelta del VIH se amplifica mediante retrotranscripción y PCR (RT-PCR) a partir del plasma del paciente, y mediante técnicas de clonaje o recombinación genética se generan virus quiméricos que portan la envuelta del paciente. Estos virus se utilizan para infectar líneas celulares que expresan 1 de los 2 correceptores de quimiocinas, CCR5 o CXCR4⁴⁻¹¹. Se han registrado varios ensayos fenotípicos entre ellos Virco® type HIV-1 (Virco BVBA, Mechelen, Belgium), Trofile® y su versión mejorada ESTA (Enhanced Sensitivity Trofile Assay) Trofile®ES (Monogram Biosciences, San Francisco, California, USA), con la que se ha incrementado entre 10 y 100 veces la sensibilidad de la prueba para detectar variantes CXCR4-trópicas en relación con la versión original. Trofile®ES es capaz de detectar la presencia de variantes que utilizan el correceptor CXCR4 si su proporción es superior al 0,3% de la población viral⁷.

Hasta el momento, Trofile® y su versión Trofile®ES, la única disponible comercialmente en la actualidad, son los únicos métodos validados y aprobados en Estados Unidos por la Food and Drug Administration (FDA) para la determinación del tropismo viral en muestras de pacientes candidatas a tratamiento con maraviroc, ya que fueron las técnicas empleadas en los ensayos de desarrollo del fármaco^{12,13}. En los ensayos Trofile®, el vector resultante de la amplificación del gen de la envuelta viral se cotransfecta en células 293T con un clon proviral que carece del gen de la envuelta y que contiene el gen marcador luciferasa. La producción viral obtenida se utiliza para infectar células U87 que expresan CXCR4 o CCR5. La característica principal de éste y otros métodos similares es conseguir amplificar la envuelta completa del VIH del paciente. Este aspecto es importante ya que,

aunque la región V3 contiene los principales determinantes del tropismo viral, existen otras regiones implicadas.

En los ensayos clínicos de desarrollo de maraviroc, MERIT y MOTIVATE, se demostró la capacidad de Trofile® para identificar a pacientes respondedores y no respondedores al fármaco, aunque también se revelaron sus limitaciones para detectar poblaciones minoritarias X4-trópicas que se asociaron con fracaso terapéutico al fármaco^{13,14}. Cuando se reanalizaron retrospectivamente las muestras basales con la actual versión Trofile®ES se reclasificó como duales/mixtas un 14,7% de las identificadas originalmente como R5 con la versión original de Trofile®¹³.

Recientemente, investigadores españoles han patentado un sistema basado en la generación de virus recombinantes con diferentes aplicaciones, una de ellas la determinación del tropismo viral^{10,11}. En este ensayo, denominado TropiTest (Instituto de Salud Carlos III-Fundación FIPSE), los virus recombinantes que se generan son virus de ciclo múltiple, lo que permite un umbral de sensibilidad para la detección de poblaciones minoritarias del 1%.

Las limitaciones técnicas de las pruebas fenotípicas han sido revisadas recientemente^{15,16}. Uno de los problemas en la interpretación de estas pruebas es la determinación del umbral con significación clínica, es decir, cuál es la sensibilidad necesaria para predecir el éxito o el fracaso del tratamiento con antagonistas de CCR5. Basándose en el análisis retrospectivo de los pacientes que fracasaron en el ensayo MERIT, se sabe que este umbral debe ser inferior al 10%¹³, pero no se conoce con seguridad qué proporción de variantes minoritarias deben detectarse para predecir mejor la respuesta clínica del tratamiento. Otras limitaciones para el uso de los ensayos fenotípicos en Europa son la accesibilidad y el coste. Trofile®ES sólo está comercializado en Estados Unidos y su coste es muy elevado. Del mismo modo que las pruebas genotípicas, los ensayos fenotípicos afrontan el desafío de determinar el tropismo viral en pacientes con cargas virales bajas (< 1.000 copias ARN/ml) o indetectables con el fin de poder tratar con antagonistas de CCR5 a pacientes con tratamiento antirretroviral efectivo. Para esto deben emplearse técnicas que analicen el tropismo a partir del ADN proviral del paciente.

Métodos genotípicos

Los métodos genotípicos se basan en la secuenciación de la región V3 de la envuelta del VIH y representan una alternativa viable y ac-

cesible en laboratorios diagnósticos con equipamiento para técnicas de biología molecular.

Los estudios preliminares de correlación entre métodos genotípicos y fenotípicos mostraron, en general, una baja sensibilidad del genotipo para la detección de variantes con tropismo X4 cuando se compararon con Trofile[®]¹⁷. Sin embargo, la introducción de mejoras en la interpretación mediante reglas y algoritmos, y la incorporación de predictores clínicos ha conseguido incrementar notablemente su sensibilidad para detectar variantes X4-trópicas¹⁸⁻²⁵. Los algoritmos más difundidos para la interpretación genotípica del tropismo en la práctica clínica son *geno2pheno* y *position-specific scoring matrix* (PSSM). El algoritmo *geno2pheno*, desarrollado por la Universidad de Colonia y el Instituto Max-Planck de Alemania²⁶ es el más utilizado. Para hacer las predicciones emplea un método estadístico denominado *support vector machine* (SVM). Puede realizar las predicciones tanto a partir de la secuencia FASTA de nucleótidos como de los aminoácidos de la región V3. Las secuencias de V3 deben introducirse de forma individual. La base de datos en la que basa sus predicciones está compuesta por más de 1.000 secuencias de V3, la mayoría de subtipo B. Esta herramienta permite seleccionar el grado de sensibilidad para detectar variantes X4, seleccionando el porcentaje de FPR (*false positive rate*) en cada predicción (1; 2,5; 5; 5,75; 10; 15, y 20%), así como introducir o no los siguientes datos clínicos: carga viral plasmática del VIH, recuento de linfocitos T CD4⁺ y la presencia o ausencia de la delección de 32 pb para el receptor CCR5. Debe tenerse presente que un aumento en la sensibilidad en la detección de variantes X4-trópicas siempre supone una pérdida en la especificidad.

El algoritmo WebPSSM permite interpretar la secuencia V3 a partir de un formato FASTA²⁷. Para realizar las predicciones, la web cuenta con los siguientes tipos de matrices: PSSM_{RSX4}, que basa las predicciones en secuencias de V3 de virus con subtipo B; PSSM_{SINSI} (*syncytium inducer*; *non-syncytium inducer*) para subtipo B y PSSM_{SINSI} para subtipo C. Las herramientas bioinformáticas PSSM_{RSX4_8} y PSSM_{SINSI_6.4} son una modificación de los algoritmos PSSM_{RSX4} y PSSM_{SINSI} que establecen nuevos puntos de corte en la predicción del uso del correceptor CXCR4²¹. Se han desarrollado algoritmos combinatorios^{22,25}, de mayor complejidad de utilización para la práctica clínica asistencial, pero que pueden resultar de utilidad en muestras de difícil interpretación.

Las pruebas genotípicas por secuenciación poblacional presentan limitaciones relacionadas con el proceso de retrotranscripción, la lectura de secuencia y su interpretación. La baja eficiencia del proceso de retrotranscripción es una limitación para la generación de fragmentos de cADN de la envuelta a partir de variantes presentes en un escaso número de copias. A esto hay que añadir que en el proceso de lectura tiene como limitación intrínseca una menor sensibilidad para las variantes minoritarias presentes en una proporción inferior al 10-20% en el conjunto de la población viral. Esta limitación explica, en gran medida, la diferencia en la sensibilidad para la detección de variantes minoritarias entre las pruebas genotípicas y las fenotípicas. Las pruebas fenotípicas son más sensibles debido al método de detección utilizado: proteínas marcadoras, virus de ciclo múltiple o altamente infectivos y dianas celulares específicas. Por último, los sistemas de interpretación del tropismo viral están basados en un número relativamente limitado de muestras con datos pareados de genotipo y fenotipo, si lo comparamos con las bases de datos empleadas para la interpretación de resistencias a los antirretrovirales. Finalmente, otra posible limitación es que la interpretación de las pruebas genotípicas actuales se basa exclusivamente en el análisis de la región V3 de gp120 y, como ya se ha mencionado, se sabe que otras regiones de la envuelta podrían tener también un cierto impacto en el tropismo^{2,3}.

Las pruebas genotípicas han demostrado su capacidad para identificar pacientes respondedores y no respondedores a un tratamiento con antagonistas de CCR5 en análisis retrospectivos de los ensayos clínicos de desarrollo de maraviroc^{28,29} y estudios ob-

servacionales³⁰⁻³³. En el reanálisis retrospectivo de los ensayos MOTIVATE²⁸ y MERIT²⁹ las herramientas genotípicas predijeron la respuesta a maraviroc de forma similar a los test fenotípicos (Trofile[®]), a pesar de que su sensibilidad para detectar variantes X4-trópicas fue menor. En algunos estudios observacionales se han comunicado tasas de respuesta a maraviroc superiores al 85% cuando los aislados de los pacientes eran clasificados genotípicamente como R5-trópicas³⁰⁻³³.

En conjunto, la información disponible sugiere que los métodos genotípicos son útiles para la determinación del tropismo viral en la práctica clínica, y están reemplazando progresivamente al fenotipo en España y en Europa^{15,16}. Es importante reconocer que en el caso de los subtipos no-B la sensibilidad de las herramientas genotípicas para la identificación de variantes X4-trópicas es menor que para los subtipos B³⁴⁻³⁶. Además, la mayor variabilidad de la secuencia V3 en subtipos no-B puede hacer que se produzcan errores en la interpretación³⁷.

Recomendaciones metodológicas para la realización del tropismo del VIH mediante pruebas genotípicas

Recientemente, un grupo de expertos españoles compuesto por virólogos, microbiólogos y clínicos ha revisado en profundidad los métodos genotípicos para la determinación del tropismo y ha elaborado un documento de consenso en el que se detallan todos los aspectos técnicos y metodológicos del proceso, incluyendo las características de las reacciones de amplificación, la interpretación e informes de los resultados, y las indicaciones para el uso clínico de esta prueba¹⁵.

Las plataformas de secuenciación más difundidas en los laboratorios, *Applied Biosystems* y *Trugene*, se consideran adecuadas para la secuenciación de la región V3. Se recomienda partir de un volumen mínimo de 500 µl de plasma y de una muestra con una carga viral plasmática ≥ 500 copias/ml. Como norma se aconseja no analizar secuencias de V3 que presenten más de 8 mezclas de nucleótidos. En estos casos, conviene repetir la amplificación y la secuenciación de V3. En cuanto a la interpretación de la secuencia y la predicción del uso del correceptor, se considera que los algoritmos *geno2pheno* y PSSM son los más adecuados¹⁵.

La realización de más de una RT-PCR puede incrementar la sensibilidad para la detección de variantes minoritarias X4-trópicas^{38,39}. En los reanálisis de los ensayos de desarrollo de maraviroc, en los que de forma retrospectiva se validó clínicamente la utilización de las herramientas genotípicas para predecir la respuesta virológica al fármaco, se realizaron 3 RT-PCR^{28,29}. Si se realizan 3 RT-PCR se recomienda la interpretación de las secuencias con *geno2pheno* FPR del 5,75%, puesto que fue con esta sensibilidad con la que se obtuvieron resultados comparables a Trofile[®]ES en la predicción de respuesta virológica a maraviroc^{28,29}.

En varios estudios observacionales, la determinación del tropismo mediante una única RT-PCR predijo también la respuesta virológica al maraviroc³⁰⁻³³, por lo que se considera que una sola RT-PCR podría ser también aceptable¹⁵. En este caso se recomienda incrementar la sensibilidad de los algoritmos de interpretación (*geno2pheno* con FPR = 10% y/o PSSM X4R5/SINSI).

La determinación del tropismo en ADN proviral mediante métodos genotípicos podría ser una opción en pacientes con carga viral indetectable y en pacientes con carga viral < 500 copias/ml en los que no se consigue amplificar a partir de plasma. La muestra biológica de elección es sangre total, que se podrá utilizar directamente o a partir de células mononucleares. Existen datos preliminares que sugieren que puede predecirse la respuesta a maraviroc con esta metodología interpretando los resultados con el algoritmo *geno2pheno* con FPR entre 10-20%⁴⁰⁻⁴².

El documento de consenso español¹⁵ recomienda que el informe de los resultados sea claro y fácil de interpretar. Se propone informar

como "tropismo R5" o "tropismo X4", ya que los métodos genotípicos no permiten clasificar cepas duales/mixtas. En la revisión de octubre de 2011 recomienda también informar el FPR en los aislados X4. Asimismo, el panel considera que sería recomendable establecer una red de laboratorios y un sistema de control de la calidad de los resultados (secuenciación e interpretación).

Nuevas técnicas: plataformas de secuenciación masiva

Como se ha mencionado, con la secuenciación poblacional habitual no pueden detectarse variantes virales minoritarias. Produce una única secuencia consenso de las miles de variantes presentes en cada paciente, de manera que sólo permite detectar los nucleótidos presentes en más de un 10-20% de la población viral. Las nuevas plataformas de secuenciación masiva basadas en la pirosecuenciación superan estas limitaciones mediante la generación simultánea de millares de secuencias clonales de virus^{43,44}.

La plataforma más empleada para el estudio del tropismo (454 Life Sciences/Roche Diagnostics) puede generar millares de secuencias de V3, cada una de las cuales corresponde a un virus individual. Una vez obtenidas las secuencias clonales se utilizan los mismos algoritmos de predicción (Geno2Pheno, PSSM, etc.) para predecir el tropismo de cada uno de los virus. Así, 454 permite detectar virus X4 presentes en < 1% de la población viral⁴⁵. Esta técnica consigue una sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo comparable a Trofile[®]ES^{46,47} y puede predecir con la misma eficacia que Trofile[®]ES la respuesta a maraviroc, tanto en pacientes *naïve* como pretratados⁴⁸.

El principal inconveniente de las plataformas de secuenciación masiva es que requieren una infraestructura compleja y un análisis bioinformático intensivo, y su coste es todavía muy elevado. Es, por tanto, una técnica reservada actualmente a laboratorios de investigación. La incorporación de sistemas de sobremesa y la disponibilidad de una herramienta de análisis semiautomático en la página web de geno2pheno, podría permitir en el futuro su introducción en laboratorios asistenciales.

Indicaciones para la realización del tropismo del VIH en la práctica clínica

Como ya se ha mencionado, la necesidad de conocer previamente el tropismo constituye un requisito imprescindible para el uso de los antagonistas de los CCR5. Maraviroc ha sido aprobado por la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento de pacientes adultos pretratados infectados por VIH con tropismo CCR5. Las características singulares de este fármaco hacen que pueda ser también considerado su uso en escenarios y/o subpoblaciones específicas de pacientes⁴⁹.

Actualmente se recomienda determinar el tropismo viral en todos los pacientes con infección por el VIH que hayan fracasado a cualquier línea de tratamiento antirretroviral y vayan a iniciar un tratamiento de rescate⁵⁰. La información del tropismo del VIH debería estar disponible junto al estudio de resistencias a todos los antirretrovirales con el fin de tener en consideración el uso de maraviroc en la pauta terapéutica de rescate.

Si bien no se recomienda la realización sistemática del tropismo viral en los pacientes no tratados previamente con antirretrovirales, debe solicitarse cuando se contemple el uso de maraviroc como una opción terapéutica en primeras líneas de tratamiento.

Agradecimientos

La Dra. Eva Poveda es beneficiaria de un contrato Miguel Servet del Fondo de Investigación Sanitaria (CP08/00214).

El Dr. Federico García es beneficiario de un contrato de intensificación de la actividad investigadora (2011) y ha sido investigador

principal de las siguientes becas de investigación sobre infección VIH: Junta de Andalucía (PI 0377/05, PI0129/07, PI0408/08, ACC004/09, PI0123/10), FIS (05/1513, 07/0207) y Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA del FISs (ISCIIR-RETIC0006/0016).

El Dr. Félix Gutiérrez es beneficiario de un contrato de intensificación de la actividad investigadora (2011) y ha recibido becas de investigación sobre infección VIH de las siguientes entidades: FIBELX (05/05, 19/2007; 20/07; 10/11; 10/12; 10/13), Generalitat Valenciana (PI051338, 083/05, AP-089/07; AP-091/07), FIS (PI081893) y Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA del FISs (ISCIIR-RETIC RD06/0027).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Esté J, Telenti A. HIV entry inhibitors. *Lancet*. 2007;370:81-8.
- Comier E, Dragic T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in HIV type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol*. 2002;76:8953-7.
- Thielen A, Lengauer T, Swenson LC, Dong WW, McGovern RA, Lewis M, et al. Mutations in gp41 are correlated with coreceptor tropism but do not improve prediction methods substantially. *Antivir Ther*. 2011;16:319-28.
- 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.
- Pérez-Olmeda M, Poveda E. Methods for determining viral tropism: genotype and phenotype tests. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; Suppl 11:40-8.
- Whitcomb JM, Huang W, Franssen 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 Suppl 3:A128.
- Van Baelen K, Vandenbroucke I, Rondelez E, Van Eygen V, Vermeiren H, Stuyver L. HIV-1 coreceptor usage determination in clinical isolates using clonal and population-based genotypic and phenotypic assays. *J Virol Methods*. 2007;146:61-73.
- González-Serna A, Leal M, Genebat M, Abad MA, García-Perganeda A, Ferrando Martínez S, et al. TROCAI (tropism coreceptor assay information): a new phenotypic tropism test and its correlation with Trofile enhanced sensitivity and genotypic approaches. *J Clin Microbiol*. 2010;48:4453-8.
- 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.º PATENTE: 200401116. N.º BOPI: 16022007.
- González N, Pérez-Olmeda M, Mateos E, Cascajero A, Álvarez A, Spijkers S, et al. A sensitive phenotypic assay for the determination of human immunodeficiency virus type 1 tropism. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2493-501.
- Gulick R, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, et al. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2008;359:1429-41.
- 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.
- Fätkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A, Konourina I, Howpelman A, Lampiris H, et al. Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2008;359:1442-55.
- Poveda E, Alcami 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.
- Vandekerckhove LP, Wensing AM, Kaiser R, Brun-Vézinet F, Clotet B, De Luca A, et al. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect Dis*. 2011;11:394-407.
- Low AJ, Dong W, Chan D, Sing T, Swanstrom R, Jensen M, et al. Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *AIDS*. 2007;21:F17-24.
- Poveda E, Briz V, Roulet V, González MM, Faudon JL, Skrabal K, et al. Correlation between a phenotypic assay and three bioinformatic tools for determining HIV co-receptor use. *AIDS*. 2007;21:1487-90.
- De Mendoza C, Van Baelen K, Poveda E, Rondelez E, Zahonero N, Stuyver L, et al. Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;48:241-4.

20. Garrido C, Roulet V, Chueca N, Poveda E, Aguilera A, Skrabal K, et al. Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Clin Microbiol.* 2008;46:887-91.
21. Poveda E, Seclén E, González M, García F, Chueca N, Aguilera A, et al. Design and validation of new genotypic tools for easy and reliable estimation of HIV tropism before using CCR5 antagonists. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:1006-10.
22. Chueca N, Garrido C, Álvarez M, Poveda E, De Dios Luna L, Zanonero 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.
23. Sánchez V, Masiá M, Robledano C, Padilla S, Ramos J, Gutiérrez F. Performance of genotypic algorithms for predicting HIV-1 tropism measured against the enhanced-sensitivity Trofile coreceptor tropism assay. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4135-9.
24. Seclén E, Garrido C, González MM, González-Lahoz J, De Mendoza C, Soriano V, et al. High sensitivity to detect X4 variants using specific genotypic tools in antiretroviral-experienced HIV patients suitable to CCR5 antagonists therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:1486-92.
25. Sánchez V, Robledano C, Lumbreras B, Padilla S, Lumbreras B, Poveda E, 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. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;56:51-8.
26. Sing T, Low AJ, Beerenwinkel 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.
27. Jensen MA, Li FS, Van't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, et al. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol.* 2003;77:13376-88.
28. McGovern R, Thielen A, Mo T, Dong W, Woods CK, Chapman D, et al. Population-based V3 genotypic tropism assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies. *AIDS.* 2010;24:2517-25.
29. 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 trofile assay in predicting virologic response to maraviroc of treatment-naïve patients in the MERIT trial. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco; 2010. [Abstract 92].
30. 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].
31. Obermeier M, Carganico A, Bieniek B, Schleeauf D, Dupke S, Fischer K, et al. Tropism testing from proviral DNA- analysis of a subgroup from the Berlin maraviroc cohort. 8th European HIV Drug Resistance Workshop. Sorrento, Italy; 2010. [Abstract 23].
32. Van Lelyveld S, Symons J, Hoepelman A, Stam A, Van Ham P, Nijhuis M, et al. Correlation of clinical outcome of maraviroc treatment with different methods to determine HIV tropism: genotypic assay, MT-2 assay and Trofile. 8th European HIV Drug Resistance Workshop. Sorrento, Italy; 2010. [Abstract 41].
33. García F, Chueca N, Álvarez M, Codoñer F, Paredes R, Téllez 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].
34. Rodríguez JJ, Seclén E, Poveda E, Varela E, Regueiro B, Aguilera A. Variability in HIV viral tropism determination using different genotypic algorithms in patients infected with B versus non-B HIV-1 subtypes. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:4-8.
35. Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Souyris C, Encinas S, et al. Genotypic prediction of human immunodeficiency virus type 1 CRF02-AG tropism. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2292-4.
36. Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Ferradini L, Cazabat M, Souyris C, et al. Prediction of HIV type 1 subtype C tropism by genotypic algorithms built from subtype B viruses. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;53:167-75.
37. Chueca N, Álvarez M, Guillot V, López Bueno MJ, Mérida MD, Peña A, et al. Genotypic estimation of coreceptor usage in HIV-infected patients from the South of Spain carrying non-B subtypes. 9th European Workshop on HIV & Hepatitis Treatment Strategies & HIV Antiviral Drug Resistance. Paphos, Cyprus; 2011. [Abstract P 45].
38. Harrigan R, Zhong X, Lewis M, Dong W, Knapp D, Swenson L, et al. The influence of PCR amplification variation on the ability of population based-PCR to detect non-R5 HIV. 8th European HIV Drug Resistance Workshop. Sorrento, Italy; 2010. [Abstract 38].
39. Raymond S, Recordon-Pinson P, Saliou A, Delobel P, Nicot F, Descamps D, et al. Improved V3 genotyping with duplicate PCR amplification for determining HIV-1 tropism. *J Antimicrob Chemother.* 2011. Epub ahead of print.
40. Seclén E, Del Mar González M, De Mendoza C, Soriano V, Poveda E. Dynamics of HIV tropism under suppressive antiretroviral therapy: implications for tropism testing in subjects with undetectable viraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:1493-6.
41. Obermeier M, Carganico A, Cordes C, Fisher K, Schuler C, Mayr C, et al. Week 48 update on the Berlin Maraviroc Cohort. 9th European Workshop on HIV & Hepatitis Treatment Strategies & HIV Antiviral Drug Resistance. Paphos, Cyprus; 2011. [Abstract P 19].
42. Seclén E, Soriano V, González MM, Sarriá C, Prosper L, Sepúlveda MJ, et al. Clinical validation of a genotypic HIV tropism assay to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists. 9th European Workshop on HIV & Hepatitis Treatment Strategies & HIV Antiviral Drug Resistance. Paphos, Cyprus; 2011. [Abstract O 23].
43. 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.
44. Margulies M, Egholm M, Altman W, Attiya S, Bader J, Bemben L. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005;437:376-80.
45. Archer J, Braverman M, Taillon B, Desany B, James I, Harrigan P, et al. Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS.* 2009;23:1209-18.
46. Pou C, Codoñer F, Thielen A, Bellido R, Cabrera C, Dalmau J, et al. High resolution tropism kinetics by quantitative deep sequencing in HIV-1-infected subjects initiating suppressive first-line ART. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, USA; 2010 [Abstract 544].
47. Saliou A, Delobel P, Dubois M, Nicot F, Raymond S, Calvez V, et al. Concordance between two phenotypic assays and ultradeep pyrosequencing for determining HIV-1 tropism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:2831-6.
48. Swenson LC, Mo T, Dong WW, Zhong X, Woods CK, Jensen MA, et al. Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients. *J Infect Dis.* 2011;203:237-45.
49. Soriano V, Perno C, Kaiser R, Calvez V, Gatell JM, Di Perri G, et al. When and how to use maraviroc in HIV-infected patients. *AIDS.* 2009;23:2377-85.
50. Panel de expertos de Gesida y Plan Nacional sobre el Sida. National consensus document by GESIDA/National AIDS Plan on antiretroviral treatment in adults infected by the human immunodeficiency virus (January 2011 update)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:209.e1-103.