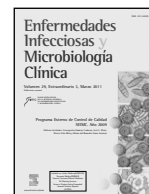




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Determinación de la carga viral del VIH-1

José María González-Alba^a, Mario Rodríguez-Domínguez^a y María Luisa Mateos Lindemann^{b,*}

^aUnidad de Virología Molecular, Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España

^bUnidad de Virología Clínica, Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España

Palabras clave:

Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

Carga viral

Antirretrovirales

RESUMEN

La determinación de la carga viral del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) es casi imprescindible para el manejo de los pacientes infectados por este virus y, sobre todo, por su utilidad como marcador de eficiencia del tratamiento antirretroviral. En este momento, la metodología empleada en la mayoría de los servicios de microbiología clínica es la PCR a tiempo real, total o parcialmente automatizada, que tiene como ventajas respecto a otras metodologías utilizadas anteriormente un mayor rango de cuantificación, mayor sensibilidad (< 40 copias/ml) y que los resultados se pueden obtener en un período muy corto, principalmente gracias a la automatización de los sistemas de extracción. En general, casi todas las plataformas comercializadas que hay en el mercado tienen estas ventajas. También es muy importante que tengan la capacidad de detectar y cuantificar correctamente los diferentes subtipos y formas recombinantes de VIH-1. Este último aspecto es el que puede plantear problemas en el futuro debido a la gran tasa de variabilidad de este virus que genera continuamente nuevos variantes virales que son susceptibles de ser cuantificados.

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

Keywords:

Human immunodeficiency virus type 1

Viral load

Antiretroviral therapy

Quantification of HIV-1 viral load

ABSTRACT

Quantification of the viral load of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is an essential marker for the follow-up of HIV-infected patients and for monitoring antiretroviral treatment. The current methodology used in most Clinical Microbiology Departments is semi- or fully-automated real-time PCR, which has several advantages such as a wider range of quantification, higher sensitivity (<40 copies/mL) and rapid results due to the automated extraction systems. On the whole, almost all the available commercialized platforms have these advantages in addition to correctly detecting and quantifying the different subtypes and recombinant forms of HIV-1 that can infect patients. This latter point is very troublesome due to the wide variation of this virus and the continuous appearance of unusual variants and subtypes susceptible to quantification.

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

Introducción

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) descrito por Montagnier y Barré-Sinoussi en 1983¹. Perteneció a la familia Retrovirus y está formado por una partícula esférica de aproximadamente 80-120 nm. En realidad son virus SIV (virus de la inmunodeficiencia de los simios) que al menos en 3 ocasiones saltaron la barrera de especie, dando lugar a los 3 principales grupos de VIH-1: grupo M (*major*), grupo O (*outlier*) y grupo N (no M no O)², y a un cuarto grupo llamado P (*putative*), descrito recientemente³. El grupo M es el que ha

causado la pandemia de sida mundial y se subdivide en 9 subtipos denominados con letras desde la A-D, F-H, J y K. Dentro del VIH-1 grupo M, el subtipo mayoritario es el C, responsable del 50% de las infecciones por el VIH; sin embargo, en los países industrializados de Norteamérica, Europa, Australia y Japón, predomina el subtipo B, por lo que el desarrollo tecnológico se ha basado en esta variante, que representa aproximadamente el 10% mundial. En los lugares donde hay una alta tasa de infección viral es probable que ocurran fenómenos de coinfecciones virales (infecciones sucesivas) o superinfecciones (infecciones simultáneas) por 2 subtipos diferentes. Cuando esto ocurre se generan variantes híbridas de los 2 subtipos que se llaman

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mmateos.hrc@salud.madrid.org (M.L. Mateos Lindemann).

formas recombinantes (CRF). En el momento actual hay 47 CRF descritas, pero éstas están en constante aumento (www.hiv.lanl.gov/content/sequence/hiv/CRFs/CRFs.html), lo que contribuirá a complicar más el sistema de clasificación de este virus.

Otros subtipos, el A, C, D y E, se encuentran frecuentemente en África y Asia⁴. Los grupos N y O son poco habituales y, principalmente, se encuentran en pacientes originarios de África ecuatorial.

Dinámica de replicación viral del VIH-1

El genoma del VIH está formado por una cadena única de ADN de polaridad positiva que mide aproximadamente 9,8 Kb y consta de 3 genes esenciales: *gag*, *pol* y *env*. Cuando infecta una célula humana (CD4+), el ARN es inmediatamente transcrito por la acción de una ADN-polimerasa-ARN dependiente, comúnmente conocida como retrotranscriptasa, generándose un ADN de doble hebra que atraviesa la membrana nuclear y que por la acción de otra enzima viral, la integrasa, se integra de manera crónica en el genoma humano. Sin embargo, este proceso sólo ocurre en el 1% de las células. En alrededor del 99%, la producción viral se mantiene por ciclos de infección de los linfocitos, producción viral y muerte con una cinética de recambio muy rápida. Se calcula que la semivida de una partícula viral en plasma es de aproximadamente 6 h, el de una célula infectada de 1 día y el de un ciclo de generación completo de 2,6 días. Este ciclo biológico fue descrito por Perelson et al en 1996⁵. Este 1% de las células que "escapan" a ese ciclo se acantona en los llamados santuarios del virus, de los que parece imposible erradicarlo⁶. Esta cinética viral y el hecho de que la transcriptasa inversa introduce errores de transcripción que producen mutaciones, origina que el virus se encuentre en el organismo como un conjunto de poblaciones genéticamente distintas relacionadas entre sí y con una población predominante. Esto se denomina *cuasiespecies* y es un mecanismo que favorece la variabilidad del virus permitiéndole evolucionar rápidamente como respuesta a presiones selectivas, bien del sistema inmunitario o por el tratamiento antirretroviral.

En la infección por el VIH-1 se pueden diferenciar 3 períodos:

1. *Primoinfección o fase aguda*. Etapa inicial en la que los valores de viremia son muy altos. Estos valores de virus en sangre aparecen aproximadamente después de 2 semanas desde la práctica de riesgo (sexual o parenteral), dura aproximadamente 3 o 4 semanas y en esta etapa se produce la diseminación del virus a órganos linfoides (santuarios).

2. *Infección crónica o asintomática*. Período en el que la fuerte respuesta inmunológica contra el virus (fase de seroconversión) reduce los valores de virus en sangre por debajo de los límites de detección de las plataformas actualmente aprobadas para su diagnóstico. Durante este período se establece una competición entre el virus y el sistema inmune del huésped: el virus genera continuamente nuevas variantes virales para escapar de la acción del sistema inmune (fenómeno de escape) y puede durar hasta 10 años. Por este motivo, la cuantificación viral no debe ser considerada como una prueba diagnóstica (salvo situaciones excepcionales). La detección de anticuerpos contra el VIH-1 es la primera prueba que se debe utilizar para hacer el diagnóstico de infección por el VIH.

3. *Aparición de sida*. Con cifras de CD4+ < 200/μl, síntomas generalizados e infecciones oportunistas graves.

Indicaciones de la determinación de la carga viral del VIH-1

La cuantificación del ARN del VIH-1 es un reflejo de la replicación viral activa y es esencial en algunas situaciones clínicas de la infección por este virus. Las indicaciones principales son las siguientes:

– La carga viral es un marcador predictivo del tiempo de progresión a sida independientemente del número de linfocitos CD4+^{7,8}. En

los primeros años de conocerse el sida se consideró el recuento de las células CD4+ como el mejor marcador pronóstico de progresión, pero en el momento actual, el procedimiento mejor para el seguimiento de los pacientes es el estudio de ambos marcadores, carga viral y recuento de células CD4+⁹.

– La cuantificación de la carga viral de VIH-1 debe ser realizada antes de iniciar un tratamiento con antirretrovirales para medir la eficacia o respuesta al tratamiento y en el caso de que se sustituya o añada algún fármaco, bien por efectos secundarios o por sospecha de fracaso¹⁰.

– Hay situaciones excepcionales en las que la carga viral es muy útil para el diagnóstico o confirmación de infección por VIH-1. Por ejemplo, en el diagnóstico de infección neonatal (la determinación de anticuerpos no es útil) e incluso cuando se sospecha infección aguda (reduce el período ventana).

Métodos comerciales de cuantificación de VIH-1

Hoy en día, la metodología utilizada en la mayoría de los servicios de microbiología clínica es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, que ha desbancado casi totalmente a otras técnicas previas como la PCR convencional, la tecnología NASBA (amplificación isotérmica de ácidos nucleicos), la reacción en cadena de la ligasa, o las tecnologías de amplificación de señal. Aunque la PCR a tiempo real está lejos de ser considerada como la técnica ideal, tiene ventajas importantes, como una buena sensibilidad analítica (< 40 copias/ml), gran reproducibilidad y linealidad, rango dinámico y, sobre todo, es capaz de cuantificar los diversos tipos y subtipos de VIH, no solamente el VIH-1 subtipo B. Este aspecto epidemiológico es muy importante y es una de las principales preocupaciones de las compañías comerciales a la hora de desarrollar sus técnicas.

En este momento hay en el mercado 4 empresas farmacéuticas (Roche, Abbott, BioMérieux y Siemens) con plataformas aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) y/o marcado CE para cuantificar el VIH a partir de muestras de plasma. Algunas de estas compañías tienen más de una versión actualmente en el mercado, basadas en tecnologías diferentes (tabla 1):

– Roche Molecular Inc. dispone de: a) Cobas Amplicor HIV-1 Monitor, que consiste en una PCR convencional bien estandarizada y ampliamente generalizada¹¹. Fue la primera compañía que puso en el mercado un sistema de cuantificación viral cuyo umbral de detección de 400 copias/ml resultó ser insuficiente como factor pronóstico del fracaso del tratamiento antiviral⁶; b) Cobas Ampliprep Taqman HIV-1 v2.0, que es una PCR a tiempo real con extracción automática que consigue cuantificar adecuadamente el VIH-1 grupo O que no podía ser detectado por la versión anterior¹². Cobas Ampliprep Taqman HIV v2.0 tiene el límite de detección más bajo entre todas las técnicas comercializadas (< 20 copias/ml).

– Abbott Molecular dispone de: a) LCx, única plataforma no perteneciente a la tecnología de PCR en tiempo real que pudo cuantificar el grupo O. No ha sido aprobada por la FDA y tiene poca entrada en los mercados; b) RealTime HIV-1 (en un consorcio de Applied Biosystems) detecta los grupos O y N, y es la única que ha podido demostrar su capacidad para detectar el recientemente descrito grupo P. El límite de detección es de < 40 copias/ml.

– Siemens Medical Solution dispone de: a) Versant HIV-1 RNA 3.0, una técnica de amplificación de señal (*branched DNA*)¹³. Probablemente es la técnica más robusta, pues no requiere amplificación de ADN. Ha mostrado siempre los mejores coeficientes de variación. Sin embargo, nunca fue aprobada por la FDA; b) hay otra versión de esta técnica que consiste en una PCR a tiempo real, Versant HIV-1 RNA 1.0 (kPCR) que aporta las ventajas de la detección del VIH-1 grupo O pero no detecta el grupo N. El límite de detección es de 35 copias/ml.

– BioMérieux dispone de: a) Nuclisens HIV-1 QT, ensayo de tecnología NASBA¹⁴. Se han publicado varios trabajos sobre problemas de

Tabla 1

Métodos comerciales de cuantificación del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)

Método	Firma comercial	Fecha de comercialización	Volumen requerido	Método de amplificación	Rango dinámico	Diana de detección	Extracción automática	Detección del VIH-1 grupo O
<i>Primera generación de plataformas para la cuantificación viral del VIH-1</i>								
Cobas Amplicor HIV-1 monitor	Roche	1996 (convencional)	200 µl	RT-PCR	400-7.510 ⁵	<i>gag</i>	Sí	No
		1999 (ultrasensible)	500 µl	RT-PCR	50-1 × 10 ⁵	<i>gag</i>	Sí	No
Nuclisens HIV-1 QT	BioMérieux	2001	1.000 µl	NASBA	176-3,4 × 10 ⁶	<i>gag</i>	Sí	No
LCx HIV-1	Abbott	2001 ^a	1.000 µl	RT-PCR	50-1 × 10 ⁶	<i>pol</i> (integrasa)	No	Sí
Versant HIV-1 RNA 3.0	Siemens	2002	1.000 µl	b-DNA	50-5 × 10 ⁵	<i>pol</i>	No	No
<i>Segunda generación de plataformas para la cuantificación viral del VIH-1</i>								
Cobas Ampliprep TaqMan HIV-1 v2.0	Roche	2008 ^b	1.000 µl ^b	PCR tiempo real	20-1 × 10 ⁷	<i>gag</i> y LTR	Sí	Sí
RealTime HIV-1	Abbott	2007	1.000 µl ^c	PCR tiempo real	40-1,1 × 10 ⁷	<i>Pol</i> (región integrasa)	Sí	Sí
Versant HIV-1 RNA 1.0 (kPCR)	Siemens	2008 ^a	650 µl	PCR tiempo real	35-1,1 × 10 ⁷	<i>Pol</i> (región integrasa)	Sí	Sí
Nuclisens EasyQ HIV-1 v1.2 ^d	BioMérieux	2009 ^a	1.000 µl	PCR tiempo real	24-1 × 10 ⁶	<i>gag</i>	Sí	No

^aNo aprobados por la Food and Drug Administration (FDA).^b850 µl sin volumen muerto.^cSimilares resultados obtenidos con 600 µl.^dNo aprobado por la FDA. Hay una versión previa aprobada en 2007 por la FDA con un límite de detección de 40 copias/ml. Recientemente, una nueva versión v2.0 ha obtenido el marcaje CE como única plataforma para la cuantificación viral en muestras de sangre seca.

subcuantificación con algunos subtipos (F) y formas recombinantes (CRF12 BF), y *b*) una versión de PCR a tiempo real ha sido aprobada en 2009 para la cuantificación viral en muestras de *dried plasma spots* (DPS).

Estudios comparativos entre las diferentes plataformas de PCR en tiempo real han mostrado resultados comparables para la detección del VIH grupo M, aunque puede haber algunas diferencias en la detección de las formas recombinantes circulantes¹⁵. En cuanto al resto de técnicas (no-PCR en tiempo real), diversos estudios publicados demuestran que los resultados son también comparables con escasas diferencias. En la mayoría de los estudios comparativos realizados, la tasa de correlación entre las técnicas utilizadas para cuantificar el ARN del VIH-1 era del 90%¹⁶⁻¹⁸. A pesar de esto, en el seguimiento de los pacientes es conveniente utilizar siempre la misma técnica a lo largo del tratamiento y, sobre todo, si se cambia de técnica hay que asegurarse de obtener una cuantificación basal del ARN VIH-1 nueva obtenida con la técnica que se va a utilizar en el futuro.

Recogida y manejo de muestras

La muestra adecuada para todas las técnicas comerciales citadas anteriormente es el plasma. El NASBA, debido a su método de extracción, permite utilizar, además de plasma, otras muestras biológicas variadas como líquido cefalorraquídeo, sangre, semen o secreciones cervicales¹⁹.

El anticoagulante ideal es el EDTA debido a que el virus es más estable en éste que cuando se utiliza como anticoagulante citrato de dextrosa. También es importante considerar que en la muestra de sangre con citrato de dextrosa el resultado puede ser más bajo por la dilución del volumen del anticoagulante añadido. La sangre con heparina no se debe utilizar nunca, excepto para el NASBA, porque está descrito que interfiere con algunos de los reactivos utilizados en las técnicas.

Un aspecto crítico en el manejo de las muestras es que se debe separar el plasma antes de las 6 h de la extracción de la sangre para así minimizar el riesgo de la degradación del ARN y, por lo tanto, para evitar la obtención de resultados inferiores a los reales. La muestra se

debe conservar a -20 °C hasta su estudio, aunque el ARN viral es estable varios días en el plasma refrigerado a 4 °C.

El volumen de plasma requerido para cada técnica varía entre 200 y 1.000 µl (tabla 1).

Interpretación y rango lineal

Para la interpretación de los resultados de cuantificación de ARN de VIH-1 se debe considerar la variabilidad intraensayo de la técnica que se está utilizando y la variabilidad debida a aspectos biológicos. En diversos estudios comparativos se ha confirmado que la variabilidad intraensayo es muy baja con la mayoría de las técnicas mencionadas, aproximadamente entre 0,1 y 0,2 log₁₀¹⁷⁻¹⁹. En general se considera que hay un cambio significativo cuando los valores medidos se diferencian en más de 0,5 log₁₀. Hay mayor variabilidad intraensayo cuanto más se acerca el resultado al límite inferior del rango lineal.

En cuanto a los aspectos biológicos a considerar en la cuantificación de la carga viral, hay que tener en cuenta que, en general, en los pacientes estables clínicamente que no han iniciado el tratamiento con antirretrovirales o en los que no hay cambios en la administración de éstos, los valores de ARN del VIH-1 son estables.

Algunas infecciones, especialmente la causada por el virus del herpes simple o la administración de vacunas (gripe, tétanos o neumococo), pueden ocasionar un ascenso transitorio del ARN del VIH-1, pero regresa a valores basales antes de 1 mes^{20,21}. Por todo esto, pequeños cambios en la cuantificación no deben ser interpretados como cambios relevantes o significativos para adoptar decisiones clínicas. Por otra parte, también hay que tener en cuenta que un resultado de carga viral indetectable no significa que el virus haya desaparecido del paciente, sino que no se detecta en sangre. No se valora el ADN proviral de VIH-1 integrado en los linfocitos o en otros tejidos del organismo que actúan como reservorios²².

Otros aspectos prácticos

La mayoría de las técnicas comerciales se han desarrollado y evaluado para el estudio de muestras que contienen el VIH-1 subtipo B. Para el resto de los subtipos no-B, los resultados de cuantificación del

VIH-1 pueden variar ligeramente, aunque estas discrepancias probablemente sean también debidas al grado de diversidad genómica dentro del subtipo.

Las técnicas comerciales mencionadas anteriormente no se pueden utilizar en países en vías de desarrollo por varias razones, la principal por motivos económicos. Sería conveniente desarrollar métodos adecuados a estas características o implantar recogida de las muestras en sistemas como los *dried plasma spots* o los *dried blood spots*. Ambos constituyen un soporte adecuado para el transporte de la muestra de sangre a laboratorios que cuenten con una infraestructura adecuada. Éste es un aspecto a desarrollar en el futuro por el aumento de pacientes con acceso a terapia antirretroviral en los países subdesarrollados.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220:868-71.
- Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med*. 2008;358:1590-602.
- Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, et al. A human immunodeficiency virus derived from gorilla. *Nat Med*. 2009;15:871-2.
- Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA, George JR, Schochetman G, Jaffe HW, et al. The emerging genetic diversity of HIV. *JAMA*. 1996;275:210-6.
- Siciliano JD, Siciliano RF. The latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells: a barrier to cure. *Curr Opin HIV AIDS*. 2006;1:121-8.
- Günthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Guatelli JV, Riggs NL, Havlir DV, et al. Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy. *J Virol*. 1998;72:2422-8.
- Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 1996;272:1167-70.
- Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med*. 199;122:573-9.
- Langford SE, Ananworanich J, Cooper DA. Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Res Ther*. 2007;4:11.
- Panel de expertos de GESIDA y Plan Nacional sobre el SIDA. Recomendaciones de GESIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana [consultado, 2-2009]. Disponible en: <http://www.msps.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/docs/recomendacionesGesidaPNSTARfebrero2009.pdf>
- Mulder J, McKinney N, Christopherson E, Sminsky J, Greenfield L, Kwok S, et al. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in plasma: application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol*. 1994;32:292-300.
- Schumacher W, Frick E, Kauselmann M, Maier-Hoyle V, Van der Vliet R, Babiak R, et al. Fully automated quantification of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS Ampliprep/COBAS Taqman system. *J Clin Virol*. 2007;38:304-12.
- Pachl C, Todd JA, Kern DG, Sheridan PJ, Fong SJ, Stempien M, et al. Rapid and precise quantification of HIV-1 RNA in plasma using a branched DNA signal amplification assay. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1995;8:446-54.
- Van Gemen B, Kievists T, Nara P, Huisman HG, Jurriaans S, Goudsmit J, et al. Qualitative and quantitative detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification. *AIDS*. 1993;7 Suppl 2:S107-10.
- Gueudin M, Plantier JC, Lemee V, Schmitt P, Chartier L, Bourlet T, et al. Evaluation of the Roche Cobas Taqman and Abbott Real Time extraction-quantification systems for HIV-1 subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;44:500-5.
- Mellors JM, Muñoz A, Giofifi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, et al. Plasma viral load and CD4 lymphocytes as prognostic marker of HIV-1 infection. *Ann Intern Med*. 1997;126:946-54.
- Cao Y, Ho DD, Todd J, Kokka R, Urdea M, Lifson JD, et al. Clinical evaluation of branched chain DNA signal amplification for quantifying HIV Type 1 in human plasma. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995;11:353-61.
- Lin HJ, Myers LE, Yen-Lieberman B, Hollinger FB, Henrard D, Hooper CJ, et al. Multicenter evaluation of quantification methods for plasma Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *J Infect Dis*. 1994;170:553-62.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990;28:495-503.
- Mole L, Ripich S, Margolis D, Holodniy M. The impact of active herpes simplex infection on human immunodeficiency virus load. *J Infect Dis*. 1997;176:766-70.
- O'Brien WA, Grovit-Ferbas K, Namazi A, Ovcak-Derzic S, Wang HJ, Park J, et al. Human immunodeficiency virus-type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination. *Blood*. 1995;86:1082-9.
- Lillo F, Grasso M, Lodini S, Bellotti MG, Colluti G. Few modifications of the COBAS Amplicor HIV Monitor 1.5 test allow reliable quantitation of HIV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol Methods*. 2004;120:201-5.