

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



6b

Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH

Editores

Emília Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Federico García García

Autores

Antonio Aguilera Guirao
Marta Álvarez Estévez
Gabriel Reina González
Carmen Rodríguez Martín



ISBN-13: 978-84-617-1842-9

ISBN-10: 84-617-1842-9

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Aguilera Guirao A, Álvarez Estévez M, García García F, Reina González G, Rodríguez Martín C. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH. 6a. García García F. (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emília Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

6b. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH. 2014

Coordinador:

Federico García García¹

Autores:

Antonio Aguilera Guirao²
Marta Álvarez Estévez¹
Gabriel Reina González³
Carmen Rodríguez Martín⁴



¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario San Cecilio, Granada. ²Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario Santiago de Compostela. ³Servicio de Microbiología, Clínica Universitaria de Navarra. ⁴Centro Sanitario Sandoval, Madrid.

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1.	Introducción.....	6
2.	Diagnóstico serológico	6
	2.1. Recogida de la muestra.....	6
	2.2. Transporte y conservación de la muestra.....	6
	2.3. Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio de Microbiología	7
	2.4. Procesamiento de la muestra	7
	2.5. Infección aguda.....	8
	2.6. Pruebas rápidas de diagnóstico	8
	2.7. Detección de antígeno p24 del VIH	8
	2.8. Ensayos confirmatorios	8
	2.9. Necesidad de un nuevo algoritmo diagnóstico	9
	2.10. Criterios para la interpretación de resultados	10
	2.11. Informe de resultados	10
	2.12. La serología en la transmisión madre-hijo y en la profilaxis post-exposición	11
3.	Determinación de la carga viral plasmática (CVP) del VIH	11
	3.1. Técnicas disponibles	11
	3.2. Indicaciones	11
	3.2.1. Monitorización del tratamiento antirretroviral (TAR)	11
	3.2.2. Valoración del riesgo de transmisión	13
	3.2.3. Diagnóstico de infección aguda.....	13
	3.2.4. Diagnóstico de la transmisión materno-fetal	13
	3.3. Tipos de muestras para la determinación de la carga viral	13
	3.4. Comunicación de resultados y variabilidad	14
	3.4.1. Respuesta al tratamiento y fracaso virológico	15
	3.4.2. Factores que aumentan la CVP	15
	3.4.3. Interpretación de viremias bajas.....	15
	3.4.4. CVP indetectable en pacientes infectados pero sin tratamiento	15
4.	Pruebas para la detección de resistencias y tropismo viral.....	15
	4.1. Técnicas genotípicas e interpretación del genotipo.....	16
	4.2. Técnicas fenotípicas e interpretación del fenotipo.....	17
	4.3. Predicción del fenotipo a partir del genotipo: fenotipo virtual.....	17
	4.4. Técnicas para la determinación del tropismo viral	18
	4.4.1. Métodos fenotípicos	18
	4.4.2. Métodos genotípicos	18
	4.5. Limitaciones de los tests de resistencia	19
	4.6. Indicaciones	20
	4.7. Los ensayos de resistencia como herramienta para epidemiología molecular	20
5.	Puntos clave	21
	5.1. Diagnóstico serológico	21
	5.2. Determinación de la carga viral	21
	5.3. Determinación de resistencias	22
6.	Bibliografía.....	22

DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-VIH-01. Diagnóstico serológico de la infección por el VIH.
2. PNT-VIH-02. Detección de la carga viral plasmática del VIH.
3. PNT-VIH-03. Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a antirretrovirales y predicción del tropismo viral.

1. INTRODUCCION

En esta década se han cumplido 30 años desde la descripción de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Durante este tiempo los laboratorios de Microbiología han tenido que hacer un gran esfuerzo para adaptarse a la demanda clínica que requieren estos enfermos. En los años 80 y 90 tuvieron que desarrollar e implantar nuevas técnicas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones oportunistas, en la segunda mitad de los 90 se generalizó el uso de las determinaciones de la carga vírica plasmática (CVP), lo que supuso el amanecer de la Microbiología Molecular, y en la primera década de este siglo se implementaron las técnicas de secuenciación para la detección y análisis de las mutaciones que confieren resistencias a los fármacos antirretrovirales.

El presente procedimiento constituye la tercera edición del “Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH” y en él se han intentado reflejar y actualizar las principales tareas y cometidos que un laboratorio de Microbiología debería tener para realizar la atención integral al paciente infectado por el VIH. Se han respetado algunos contenidos de los procedimientos anteriores así como el objetivo de la segunda edición (2006): orientar de forma conceptual y práctica la metodología empleada en el diagnóstico y seguimiento de la infección por el VIH. Asimismo, se mantiene su estructura en los 3 apartados anteriores: diagnóstico serológico, que ha sufrido una importante renovación, intentando adecuarnos a las demandas diagnósticas y epidemiológicas actuales, y contribuyendo a disminuir las oportunidades perdidas en cuanto al diagnóstico. En una segunda parte se describe la determinación de la CVP, y se hace una exhaustiva revisión de los avances tecnológicos y de las recomendaciones actuales, además de abordar un tema de enorme interés clínico, la significación clínica de la viremia persistente de bajo grado. Finalmente, en el tercer apartado se desarrolla el tema de las resistencias a los fármacos antirretrovirales, incorporando como novedades las técnicas de determinación del tropismo viral, y el papel de las variantes minoritarias. Asimismo, se ha incorporado un cuadro resumen con los “puntos clave” en cada uno de los capítulos.

Los autores de este procedimiento agradecen a todas las personas que han contribuido de una forma u otra

a que esta nueva versión vea la luz, especialmente al coordinador y autores de la edición de 2006, los Dres. López Bernáldez de Quirós, Ortiz de Lejarazu, Delgado Vázquez y Eiros Bouza.

2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

El diagnóstico de la infección por el VIH se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero o plasma del paciente. La elección de la técnica apropiada y del algoritmo diagnóstico, dependerán del objetivo a alcanzar. Las pruebas diagnósticas son las que se utilizan de forma individualizada, previo consentimiento informado, oral o escrito, con el fin de identificar una infección por el VIH.

2.1. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Se puede realizar en el mismo laboratorio o en distintos puntos de extracción de sangre y enviarse posteriormente al laboratorio. El personal de estos puntos de extracción tiene que estar entrenado para la correcta y minuciosa identificación de los pacientes y sus muestras, comprobar el etiquetado con sus volantes correspondientes y guardar la confidencialidad en todo el proceso.

Los laboratorios que reciben y almacenan los sueros deben mantener un sistema de recepción y registro de muestras controlado para evitar errores. Todos estos procesos son fundamentales para la posterior determinación de anticuerpos frente al VIH.

2.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Después de su recogida, las muestras de suero no se deben mantener más de 24 horas a temperatura ambiente ni más de 7 días entre 2°C y 8°C. Si se prevé un periodo de almacenamiento más prolongado es necesaria la congelación a -20°C o -80°C. Se recomienda no someter las muestras a múltiples ciclos de congelación y descongelación. Los sueros no deben inactivarse por calor.

Para su transporte las muestras se deben preparar y etiquetar de acuerdo con las normas vigentes en el transporte de sustancias infecciosas. Se pueden enviar refrigeradas con hielo entre 2°C y 8°C, o con nieve carbónica para una temperatura igual o inferior a -20°C.

2.3. MANEJO DE LA MUESTRA EN SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Todos los laboratorios que realicen diagnóstico serológico de anticuerpos frente al VIH deben respetar las normas de seguridad de nivel 2. Las muestras de origen humano se deben considerar y manipular como potencialmente infecciosas. En todos los procesos llevados a cabo es necesario utilizar guantes y eliminar los residuos, reactivos y muestras en contenedores de seguridad para su eliminación posterior siguiendo las normas de productos biológicos infecciosos. Se han desarrollado directrices de buenas prácticas de laboratorio y, si se respetan, se puede garantizar la seguridad y mantener al mínimo los accidentes de laboratorio.

2.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

El diagnóstico de infección por el VIH se hace generalmente mediante un procedimiento de serología, es decir, la detección de anticuerpos VIH-1/2 o la detección simultánea de anticuerpos VIH-1/2 y del antígeno p24 del VIH-1. Los ensayos serológicos para esta determinación pueden ser de cribado (*screening*) o de confirmación. Los ensayos de cribado identifican las muestras reactivas y deben tener una sensibilidad superior, y los ensayos de confirmación permiten conocer si las muestras reactivas con un ensayo de cribado, contienen anticuerpos específicos para el VIH-1/2 y deben tener una especificidad superior.

Como prueba de *screening* el inmunoensayo es el más coste-efectivo para llevar a cabo en un entorno de laboratorio con un volumen importante de muestras. Debido a la diversificación de la terminología en cuanto a la denominación de los inmunoensayos (EIA, CLIA, CMIA, QIA, etc) en este procedimiento se engloban todas con dicho término. Estas técnicas requieren equipos automáticos y un técnico experimentado y con competencias para realizarlas.

Los inmunoensayos han ido evolucionando, y se clasifican en función de la base antigénica utilizada. Los de primera generación, que incorporaban lisado viral como antígeno, eran relativamente sensibles, pero carecían de especificidad, y se detectaban los anticuerpos a los 40 días de la infección. Posteriormente, se desarrollaron ensayos de segunda generación que utilizaban como antígenos proteínas recombinantes y péptidos sintéticos que detectaban anticuerpos frente a los subtipos del grupo M, los grupos N y O, y

también frente al VIH-2. Con la utilización de estos, se acortó el tiempo de detección de anticuerpos a 33-35 días de la infección. Los inmunoensayos de tercera generación o tipo sándwich, detectan anticuerpos de clase IgG e IgM acortando el tiempo de detección de 20 a 25 días. Por último, se han introducido las técnicas de cuarta generación que detectan simultáneamente anticuerpos y antígeno p24, reduciéndose el tiempo de detección a 13-15 días después de la infección. Con estas técnicas de cuarta generación la sensibilidad aumenta y se reduce la posibilidad de un falso negativo, aunque hay que tener en cuenta que esta circunstancia se puede dar, sobre todo, en la primera fase de la infección hasta que se produce la seroconversión (periodo ventana), y en menor medida, en estadios finales de la infección, en pacientes con tratamiento inmunosupresor, trasplantados de médula ósea y en personas con alteraciones de linfocitos B.

Actualmente se está evaluando un nuevo inmunoensayo de cuarta generación que permite la detección e identificación de forma individual de los anticuerpos del VIH-1, anticuerpos del VIH-2 y del antígeno p24 del VIH-1.

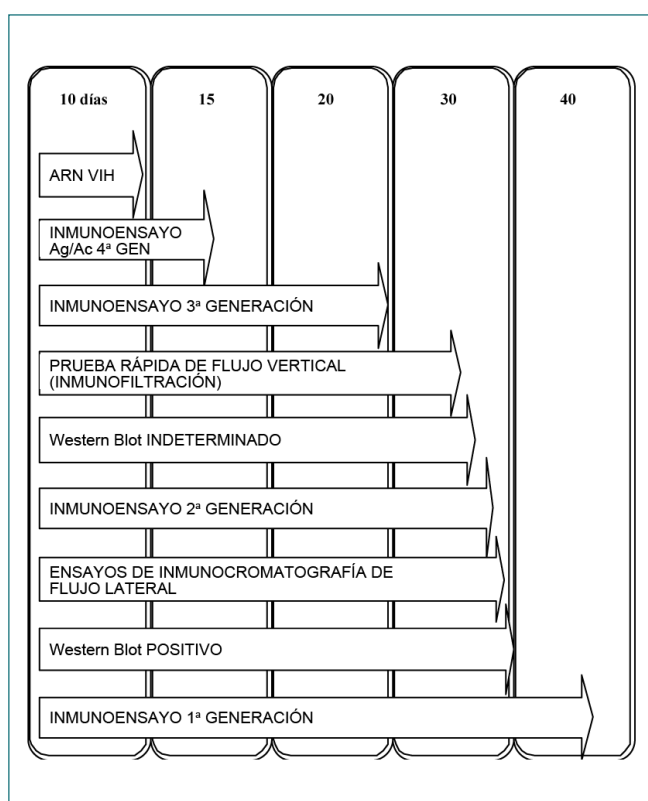


Figura 1. Días transcurridos desde la fecha de infección hasta que se positivizan las técnicas de diagnóstico de infección por el VIH-1

La figura 1 muestra el tiempo hasta la positividad de los distintos marcadores y técnicas para el diagnóstico de la infección por VIH.

2.5. INFECCIÓN AGUDA

Es la primera etapa de la infección por el VIH, inmediatamente después de ésta y antes del desarrollo de los anticuerpos. El 50% de las personas pueden desarrollar manifestaciones clínicas sugestivas de un síndrome retroviral agudo. En esta fase, existen niveles elevados del virus y los pacientes presentan altas tasas de transmisión debido a la alta carga viral, por lo que el cribado en esta fase es especialmente importante para la prevención del VIH. Se calcula que casi la mitad de las nuevas infecciones se producen desde una persona con infección temprana. Las pruebas convencionales para el diagnóstico de la infección por el VIH, a veces no detectan la infección aguda. Al comienzo de la infección hay un aumento de la carga viral en plasma que coincide con un pico en el nivel de antígeno p24. Más tarde, la disminución de la carga viral y los niveles de antígeno p24 coinciden con el incremento de los niveles de anticuerpos. La infección aguda se puede diagnosticar mediante la detección del ARN-VIH en una muestra con un inmunoensayo negativo, o cuando se detecta un inmunoensayo positivo con un test confirmatorio negativo o indeterminado y una prueba virológica (ARN-VIH o antígeno p24) positiva.

2.6. PRUEBAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO

Son técnicas de rápida ejecución, no necesitan aparataje, su lectura es visual y subjetiva y generan un resultado en menos de 30 minutos. Cuando el resultado es reactivo se considera preliminar y se debe enviar una muestra del paciente al laboratorio de Microbiología para confirmar con técnicas suplementarias. En un principio las pruebas rápidas se usaban en situaciones de urgencia, hoy día también se utilizan pruebas rápidas con licencia CLIA en entornos no clínicos comunitarios, en farmacias y en laboratorios que procesan un número bajo de muestras diarias. Debido a su simplicidad, coste y rápida respuesta, la OMS recomienda el uso de pruebas rápidas en entornos de recursos limitados, más que para el diagnóstico en un laboratorio convencional. Las pruebas rápidas se pueden realizar en fluido oral o en sangre capilar recogida por un procedimiento sencillo mediante punción digital y no requieren muestra de punción venosa, aunque también se pueden realizar en muestras de suero o plasma. Emplean antígenos similares a los inmunoensayos. Detectan la presencia de anticuerpos VIH-1, VIH-2 y/o

el antígeno p24 del VIH-1. La sensibilidad y la especificidad son buenas. Pueden ser de inmunoadherencia inmunocromatográfica (flujo lateral) y de inmunoadherencia por inmunofiltración o inmunocentración; aunque ambas se realizan en menos de 30 minutos, estas últimas necesitan más manipulación. El inconveniente de las pruebas rápidas es su lectura subjetiva que puede generar dudas de interpretación en los resultados. Estas pruebas tienen una alta sensibilidad y especificidad pero inferior a la de los inmunoensayos utilizados actualmente en el diagnóstico convencional. Sin embargo, las pruebas rápidas no pueden identificar las infecciones agudas, donde aún no se han desarrollado anticuerpos específicos del VIH (falsos negativos). Aunque se dispone de alguna prueba rápida combinada (Combo) de cuarta generación que detecta anticuerpos y antígeno p24, no parece ser tan sensible como la prueba combinada estándar utilizada en los laboratorios. La prueba rápida combinada tiene buen rendimiento para la detección de la infección por el VIH ya establecida y menor rendimiento para detectar la infección aguda.

2.7. DETECCIÓN DE ANTÍGENO p24 DEL VIH

El antígeno p24 es una proteína del núcleo viral que aparece en sangre después de la infección por el VIH, coincidiendo con el aumento del nivel del ARN viral. Los ensayos disponibles han incrementado el rendimiento diagnóstico, con una sensibilidad del 89% a casi 100% en comparación con la detección del ARN. El ensayo de detección del antígeno p24 detecta un nivel de antígeno que corresponde aproximadamente a un nivel de ARN del VIH de 30.000 a 50.000 copias/mL y se convierte en positivo, aproximadamente, de cinco a siete días después de la detección del ARN viral. El ensayo del antígeno p24 también está disponible en pruebas combinadas de anticuerpo/antígeno, pero cuando el resultado es positivo no distingue si la detección es de antígeno o de anticuerpo. Esta prueba apenas se utiliza hoy en día, su uso queda prácticamente restringido a los ensayos tipo Combo, y en algunos laboratorios se utiliza para el diagnóstico de la infección vertical.

2.8. ENSAYOS CONFIRMATORIOS

Hasta ahora los más usados son el *Western Blot* (WB) y el inmunoensayo en línea (LIA). Ambas técnicas pueden llevar antígenos de envoltura del VIH-2, para poder diagnosticarlo. Existen también ensayos específicos para VIH-2. Uno de sus principales inconvenientes

es la lectura de las bandas para hacer la interpretación, que la mayoría de las veces es subjetiva, por lo que es necesario establecer una norma de lectura en cada laboratorio. La interpretación de los resultados es complicada: la ausencia de bandas se interpreta como un resultado negativo, y para valorar los resultados positivos se pueden aplicar varios criterios establecidos por distintas organizaciones. La OMS considera un resultado positivo cuando hay al menos dos bandas de glicoproteínas, el *Center for Diseases Control* (CDC) dos bandas de p24, gp41, y gp160/gp120, la Cruz Roja Americana (ARC) tres bandas, una de cada gen estructural, y el Consorcio de Estandarización de la Serología de Retrovirus (CRSS) establece que tiene que existir una banda de glicoproteína más otra que no sea de envoltura. También se pueden seguir los criterios de interpretación suministrados por el fabricante del ensayo confirmatorio. Se considera un WB indeterminado cuando se observan reactividades distintas a las del criterio de positividad, y es en este punto donde surgen más problemas de interpretación. Un resultado indeterminado puede ser debido a distintas causas: infección aguda o estadio muy avanzado de la enfermedad, recién nacidos de madre seropositiva, sueros inactivados por el calor, pacientes con factor reumatoide, reacciones cruzadas con otros retrovirus y otras causas. Un resultado de WB indeterminado hay que analizarlo meticulosamente y valorar las bandas reactivas ya que tienen distinto valor predictivo. En estos casos es conveniente realizar la determinación de una carga viral para evaluar una posible infección aguda y al mismo tiempo solicitar una nueva muestra. Al analizar ésta, puede ocurrir que la situación de las bandas no haya cambiado, en cuyo caso, se puede tratar de una reacción inespecífica o que las bandas hayan aumentado en número e intensidad y posiblemente sea una seroconversión. En todas estas situaciones hay que solicitar una nueva muestra al mes. La comparación directa de algunas de las técnicas más recientes con la prueba de WB, ha demostrado que se obtienen resultados positivos días o semanas antes que el WB resulte positivo o indeterminado.

El algoritmo actual con inmunoensayo más WB o LIA, es lento, costoso y requiere un equipo sofisticado que hace que sea difícil llevar a cabo en entornos con pocos recursos. Por todo ello, surge la necesidad de una prueba de confirmación más sencilla, más barata y más rápida. Actualmente se dispone de un sistema de confirmación y diferenciación individualizada del VIH-1 y el VIH-2. Se trata de una prueba inmunocromatográfica que contiene péptidos recombinantes o sintéticos específicos para el VIH-1 (gp160, gp41, p31, p24) y

para el VIH-2 (gp140, gp36) su lectura e interpretación están automatizadas, lo que implica una lectura objetiva, cada banda es interpretada de forma automática y cualitativa. La emisión del resultado final está también automatizado y se obtiene en menos de treinta minutos. Posee un buen nivel de discriminación entre el VIH-1 y el VIH-2, mayor que el LIA.

2.9. NECESIDAD DE UN NUEVO ALGORITMO DIAGNÓSTICO

Múltiples estudios y diferentes organismos internacionales, motivados por la necesidad de agilizar el diagnóstico de la infección por el VIH, abogan por la búsqueda de nuevos algoritmos con el propósito de: a) reducir la transmisión del VIH, que se ha demostrado que se produce fundamentalmente en las primeras semanas de la infección, y b) intentar que no se pierdan oportunidades de diagnóstico, disminuyendo el tiempo de espera para los resultados positivos de la prueba del VIH, consiguiendo así la rápida notificación a los médicos y a los pacientes. Además, esta necesidad surge ante las limitaciones para confirmar la infección del VIH-1, en muestras de pacientes con resultado del inmunoensayo de tercera o cuarta generación positivo y WB negativo o indeterminado. Las pruebas suplementarias de anticuerpos del VIH no tienen por qué limitarse al WB, LIA o IFA. Las guías aprobadas en el documento CLSI-M53-A (2011), incluyen un algoritmo que indica que las muestras reactivas en el *screening* con inmunoensayos de cuarta generación deben ser analizadas con un ensayo suplementario que sea capaz de confirmar y diferenciar anticuerpos del VIH-1 y VIH-2. Este nuevo algoritmo se ha puesto en marcha en EE.UU. con muy buenos resultados. Asimismo, se han aceptado otras pruebas como suplementarias, incluyendo algunas que alternativamente, podrían ser utilizadas como prueba de cribado, siempre que las primeras pruebas y las suplementarias se utilicen conjuntamente como partes de un algoritmo aprobado.

La propuesta de un nuevo algoritmo para los laboratorios asistenciales (figura 2) incluye en primer lugar, realizar un inmunoensayo tipo Combo de cuarta generación, que acorta significativamente el periodo ventana. Si resulta no reactivo, se interpreta como negativo. Si el inmunoensayo Combo de cuarta generación es reactivo se repite por duplicado inmediatamente, y las muestras repetidamente positivas se analizan mediante un ensayo de diferenciación del VIH-1 y VIH-2, asegurando tiempos de respuesta lo más cortos posibles. Si este es concluyente, se informa como positivo para el VIH-1 y/o positivo para el VIH-2, y se recomienda

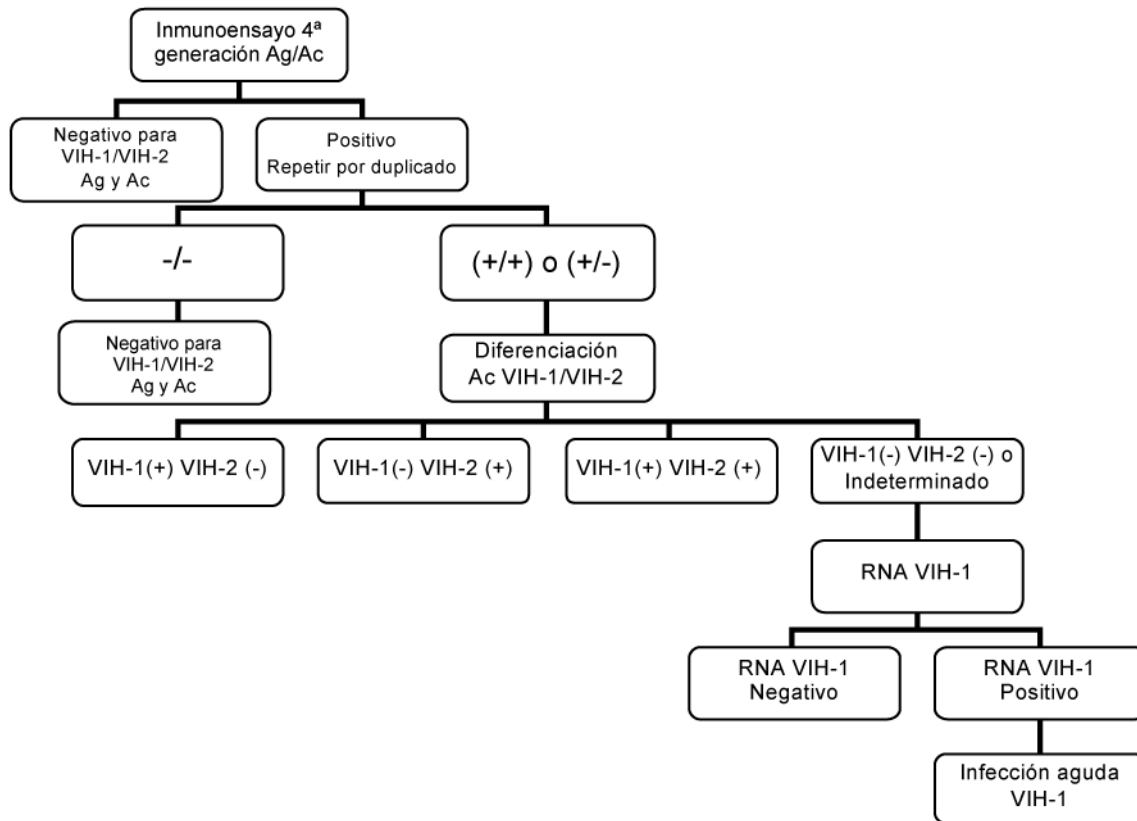


Figura 2. Algoritmo diagnóstico

solicitar el envío de una segunda muestra, sólo para verificar que no han existido errores en la fase preanalítica, pero no hay que esperar al resultado de ésta para emitir el diagnóstico. Si el inmunoensayo Combo y el de diferenciación son discordantes, se realiza una determinación del ARN VIH-1, y si éste resulta positivo, siempre que se obtengan valores altos (ver apartado de carga viral de este documento), se puede informar como una infección aguda por el VIH-1; si el ARN VIH-1 es negativo estaremos ante la ausencia de infección por el VIH-1 (falso positivo) o una posible infección aguda por el VIH-2, situación muy poco probable dada la baja prevalencia de infección por VIH-2 en España. El algoritmo también se puede comenzar con un inmunoensayo de tercera generación, pero se perderá alguna infección aguda, al no tener la capacidad de detectar el antígeno p24 del VIH-1.

2.10. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los inmunoensayos actuales tienen una sensibilidad mayor del 99%. Sin embargo no hay que olvidar la importancia de los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN), que están condicionados por la pre-

valencia de la infección por el VIH entre la población estudiada. A menor prevalencia, el VPP disminuye y mayor es la probabilidad de que se produzcan falsos positivos.

Las causas de los resultados falsos positivos son muy variadas: errores en la identificación de la muestra, hemólisis, contaminación microbiana del suero, inactivación de la muestra por calor. También se han notificado en pacientes con enfermedades autoinmunes, en multíparas, en pacientes multitransfundidos o en hemodiálisis, en personas con infección por otros virus como el VPH y el VHB, en individuos recién vacunados frente al VHB y la gripe, y en pacientes con anticuerpos frente a distintos antígenos HLA.

2.11. INFORME DE RESULTADOS

Los resultados de las pruebas de cribado deben expresarse de forma clara y precisa para evitar situaciones diagnósticas confusas y de ansiedad innecesaria en el paciente. Se informará con claridad si el suero es positivo para VIH-1 y/o para el VIH-2. En el caso que no se llegue a un diagnóstico definitivo, se darán las pautas específicas a llevar a cabo, para poder llegar a un diagnóstico concluyente.

2.12. LA SEROLOGÍA EN LA TRANSMISIÓN MADRE-HIJO Y EN LA PROFILAXIS POST-EXPOSICIÓN

El papel de la serología en el diagnóstico del VIH en el recién nacido es limitado. En este caso, el diagnóstico requiere de técnicas de biología molecular (ADN proviral o carga viral), ya que la determinación de anticuerpos carece de valor al detectarse los anticuerpos maternos. En caso de serología positiva en el recién nacido, se requiere un seguimiento serológico de hasta 6 meses para verificar la desaparición de anticuerpos.

Para la profilaxis post-exposición, la serología se utiliza para el diagnóstico de la infección VIH en el caso fuente de la exposición, siguiendo las recomendaciones que se describen en los apartados anteriores. Además, se emplea para el seguimiento del personal que se ha visto expuesto.

3. DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL PLASMÁTICA (CVP) DEL VIH

La carga viral del VIH o viremia plasmática representa la cantidad de virus presente en plasma y se expresa como número de copias de ARN por mililitro o en $\log_{10}$. Su determinación, junto con el recuento de linfocitos CD4, son los parámetros que se utilizan en la monitorización del tratamiento antirretroviral y para tomar decisiones respecto a cambio del mismo.

3.1. TÉCNICAS DISPONIBLES

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 (Tabla 1). Dichas plataformas emplean la PCR a tiempo real, que consigue altos niveles de sensibilidad analítica, reproducibilidad y linealidad. Todas ellas incorporan métodos automatizados de extracción de ARN, reduciendo el tiempo de procesamiento, la variabilidad y el riesgo de contaminación, permitiendo además procesar un elevado número de muestras. Todos ellos realizan una retrotranscripción previa del ARN del VIH-1 a ADNc, posteriormente se amplifica la diana con una PCR a tiempo real generándose moléculas fluorescentes que están ligadas a sondas oligonucleótidas que se unen específicamente al producto amplificado. Cuando la fluorescencia excede una señal mínima en el ciclo umbral (*Cycle threshold*-Ct-), el número de ciclos de PCR que hayan transcurrido se usa para la

cuantificación. Una de las ventajas de esta tecnología es que permite detectar y cuantificar la diana sin tener que manipular los tubos de reacción. El límite inferior de detección varía entre las 20-100 copias/ml dependiendo de la técnica, empleando un volumen de partida que varía entre 0,5-1,2 ml de plasma. Detectan la CVP en todos los subtipos B y no-B del VIH-1 grupo M, algunas incluso el VIH-1 grupo O, sin embargo no detectan la CVP de VIH-2. Se ha descrito variabilidad entre dichas técnicas, sobre todo en la cuantificación de los subtipos no-B, por lo que se recomienda la monitorización de la CVP de un paciente siempre con el mismo sistema. Si se hace inevitable el cambio de equipo 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. Además de estas plataformas, se han desarrollado ensayos que permiten detectar una sola copia de ARN del VIH-1, no comerciales y utilizados en investigación.

3.2. INDICACIONES

3.2.1. Monitorización del tratamiento antirretroviral (TAR)

La CVP es el principal factor para la monitorización del TAR. Ésta desciende de forma acusada tras la instauración del TAR, cuyo objetivo, según la guía de GESIDA es reducir la carga viral rápidamente por debajo de los límites de detección de la técnica (20-75 copias/mL) en 16-24 semanas 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. Cuando la carga viral basal sea muy elevada el objetivo del tratamiento sería un descenso superior a 1 $\log_{10}$ tras cuatro semanas. Se recomienda medir la CVP al comienzo del TAR y a las 4 semanas, y realizar el seguimiento cada 3-4 meses, pudiendo espaciarse hasta los 12 meses su determinación en pacientes con cargas repetidamente suprimidas y estables clínica e inmunológicamente (recuento de linfocitos CD4 > 350 células/ μ L). Se considera que hay un fracaso virológico, siguiendo las indicaciones de la guía de GESIDA, cuando la carga viral es detectable pasadas 24 semanas desde el comienzo del tratamiento antirretroviral, o si tras alcanzar la indetectabilidad ésta vuelve a ser >50 copias/mL en dos determinaciones consecutivas separadas 2-4 semanas. En esta situación, lo primero que es necesario comprobar es que haya un correcto cumplimiento terapéutico, la tolerabilidad del tratamiento y las interacciones entre fármacos y entonces decidir si realizar un estudio de resistencias. También se determinará la CVP en aquellos pacientes con buen control virológico en los que

Tabla 1. Técnicas disponibles para la detección de la carga viral plasmática.

	Abbott RealTime HIV-1 (m2000rt)	COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan HIV-1, v2.0 (Roche)	NucliSens® EasyQ HIV-1 v1.2 (bioMérieux)	VERSANT® HIV-1 RNA 1.0 (kPCR) (Siemens)	Artus HI Virus-1 QS-RGQ (Qiagen)
Amplificación	PCR a tiempo real	PCR a tiempo real (TaqMan)	NASBA y detección en tiempo real con molecular beacons	PCR a tiempo real (TaqMan)	PCR a tiempo real
Rango de carga viral	40 copias/mL 10 millones copias/mL	20 copias/mL 10 millones copias/mL	10 copias/ml 10 millones copias/ml	37 copias/mL 11 millones copias/mL	34 copias/mL 44 millones copias/mL
Subtipos	Grupo M –subtipos A-D, F-H, J; varios CRFs, incluidos CRF01_AE y CRF02_AG; grupo N y O. No detecta VIH-2	Grupo M –subtipos A-D, F-H, varios CRFs, incluido CRF01_AE y CRF02_AG; grupo O. No detecta VIH-2	Grupo M –subtipos A-D, F-H, J; CRF01_AE y CRF02_AG. No detecta VIH-2	Grupo M –subtipos A-D, F-H, CRF01_AE y CRF02_AG; grupo O. No detecta VIH-2	Grupo M –subtipos A-D, F-H No detecta VIH-2
Grado de automatización	Equipo de extracción automatizada separado del equipo de amplificación/detección	Equipo integrado en una plataforma	Equipo de extracción automatizada separado del equipo de amplificación/detección	Equipo de extracción automatizada separado del equipo de amplificación/detección	Equipo de extracción automatizada separado del equipo de amplificación/detección
Empleo de tubo primario con código de barras	Sí	No	Sí	Sí	Sí
Tiempo de procesamiento	6 h	6 h	4 h	5,15 h	5 h
Número de test/run	96	72	72	96	72

se plantea una modificación del tratamiento por toxicidad farmacológica o una simplificación del régimen. Después de un cambio de TAR en este contexto se debe evaluar en un plazo de 3-6 semanas el mantenimiento de la supresión virológica y, una vez demostrada se puede continuar con las revisiones periódicas cada 4-6 meses.

3.2.2. Valoración del riesgo de transmisión

La CVP se correlaciona con el riesgo de transmisión del VIH, de tal manera que cuanto mayor es la CVP mayor es el riesgo de transmisión. Aunque no puede excluirse completamente, la transmisión es poco probable por debajo de 1000 copias/mL. Esta cifra junto a las características de la exposición condicionan las diferentes pautas de profilaxis post-exposición. En este sentido, hay estudios en los que se ha demostrado que el descenso de la viremia en la población general (carga viral comunitaria) se ha correlacionado con un menor evento de transmisión.

3.2.3. Diagnóstico de infección aguda

Es necesario destacar, que la elevada sensibilidad de los ensayos de cuantificación de la carga viral puede originar un uso inapropiado de los mismos, como ocurre cuando se utilizan para el diagnóstico de la infección por el VIH durante las primeras semanas de la infección, cuando los anticuerpos específicos anti-VIH no son detectables. En estas situaciones, o cuando los inmunoensayos son positivos pero el confirmatorio es negativo o indeterminado, se puede emplear la CVP para realizar el diagnóstico siempre y cuando se obtenga un nivel de carga viral elevado. Las pruebas de carga viral no se han desarrollado con una especificidad suficiente y pueden causar falsos positivos, por tanto, cuando en estas situaciones se obtenga una carga viral baja es preferible utilizar otras pruebas genéticas de tipo cualitativo con sensibilidad y especificidad ampliamente demostrada, como la detección del ADN proviral. No obstante, las actuales técnicas serológicas de cuarta generación al determinar antígenos además del anticuerpo reducen significativamente el período ventana.

3.2.4. Diagnóstico de la transmisión materno-fetal

Existen situaciones especiales en las que la determinación de la CVP se puede emplear como diagnóstico de la infección por el VIH, como es el caso del diagnóstico en recién nacidos de madres infectadas, ya que en estos casos los anticuerpos maternos se transfieren al niño y el diagnóstico serológico podría dar un falso positivo. Se considerarán válidos sólo aquellos

resultados en los que el nivel de viremia sea elevado (> 5000 copias/mL), si no, es preferible descartar la infección mediante el uso del ADN proviral. Se necesita un seguimiento del recién nacido de hasta 6 meses para descartar la infección, siempre y cuando no se haya administrado lactancia materna.

3.3. TIPOS DE MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL

La muestra recomendada para realizar la determinación de la CVP es la sangre anticoagulada con EDTA o citrato (ACD) en cantidad de 5-10 mL. El plasma obtenido con heparina no es adecuado para detectar la viremia plasmática ya que es ampliamente conocido su efecto inhibitor sobre la PCR.

Los tubos con EDTA son los más ampliamente utilizados. En ellos, el plasma se debe separar por centrifugación a 1000-1500xg (2000-2500 rpm en las centrifugas habituales) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Existe un tubo especial para técnicas de biología molecular (Vacutainer PPT) con un gel que, una vez centrifugado, separa el plasma de la porción celular. Este tubo PPT es práctico para transportar el plasma separado en el tubo primario, sin embargo, parecen aumentar artefactualmente el número de muestras con viremia de bajo nivel debido a la detección de ARN viral asociado a células. Este hecho se podría solucionar con una centrifugación adicional de la muestra previa a su procesamiento en el laboratorio de destino.

En la tabla 2 se muestra la estabilidad máxima estudiada del VIH-1 según el modo de almacenamiento para la determinación de la CVP, es decir, sin que disminuya su concentración en la muestra, aunque cada casa comercial emite sus propias recomendaciones según sus estudios de validación para realizar serología o la PCR.

En países con pocos recursos, se ha propuesto la utilización de gotas de sangre seca (*dried blood spots* -DBS-) para determinar la carga viral del VIH de un paciente ya que este método facilita la recogida, transporte y conservación de las muestras. La técnica consiste en realizar un pinchazo en el dedo o el talón y depositar la sangre directamente sobre un papel de filtro que se deja secar a temperatura ambiente. Una vez seco, el DBS se puede almacenar con desecante y enviarse a los laboratorios centrales para realizar cuantificación o caracterización del VIH. En este soporte el ARN viral permanece estable a temperatura

Tabla 2. Estabilidad del VIH-1 para determinación de la carga viral plasmática

Sangre completa		6 horas
Plasma separado	Temperatura ambiente	<24h
Plasma separado	4°C	<7 días
Plasma separado	-20°C	1-3 meses
Plasma separado	-80°C	>3 meses

ambiente durante un largo período de tiempo, supone una metodología muy fácil y económica, además de facilitar el transporte como mercancía no peligrosa, al estar el virus inactivado. Previo a la extracción de los ácidos nucleicos a partir de la muestra, ésta debe ser reconstituida en medio líquido mediante el tratamiento térmico del DBS fragmentado con buffer de lisis de tejidos y proteinasa K.

La carga viral realizada sobre DBS muestra una buena correlación con la CVP, siendo el límite de sensibilidad de la técnica de 1000-5000 copias/mL aproximadamente, por lo que constituye una opción válida para la monitorización del TAR en áreas geográficas en vías de desarrollo, donde la detección temprana del fracaso virológico suele ser difícil debido a las dificultades para realizar la CVP —equipamiento de alto coste, falta de personal cualificado, transporte y almacenamiento adecuado de muestras desde zonas remotas, etc. La carga viral en DBS, sin embargo, puede también generar falsos positivos debido a la detección de ADN proviral o ARN viral asociado a células. La especificidad de la técnica aumenta cuando las cuantificaciones son superiores a 3000 copias/mL, cifra muy cercana al *cut off* propuesto por la OMS de 1000 copias/mL para determinar el fracaso virológico. Esta detección de ADN proviral y ARN asociado a células permite aplicar también esta metodología en DBS para la detección precoz de la transmisión madre-hijo de VIH en las áreas más desfavorecidas con una sensibilidad y especificidad cercana al 100%.

Por otro lado, se están desarrollando otras estrategias para poder determinar la CVP en pacientes de zonas

alejadas o rurales como la realización de sencillos tests *point-of-care* (pruebas a pie de paciente) en microchip tras concentración de las muestras, o la estabilización y extracción del ARN en el centro asistencial antes de su envío al laboratorio central.

Además se ha aplicado la determinación de carga viral sobre muestras como LCR, semen, muestras cervicovaginales o tejidos. Normalmente se requiere la extracción previa de los ácidos nucleicos ya que la viscosidad de algunas de estas muestras impide su procesamiento automático por algunos sistemas. Mayoritariamente se trata de procedimientos aplicados en estudios de investigación para comparar riesgo de transmisión o supresión virológica fuera del plasma, por lo que la interpretación de los resultados adquiere significado únicamente dentro del contexto en que se realiza.

3.4. COMUNICACIÓN DE RESULTADOS Y VARIABILIDAD

Para expresar los resultados cuantitativos de la CVP se emplean habitualmente escalas logarítmicas. Éstas permiten manejar más fácilmente las cuantificaciones en valor absoluto que presentan los virus en replicación, que comprenden varios órdenes de magnitud.

La mayoría de las técnicas expresan los datos en valor absoluto y en escala logarítmica. La variabilidad inherente a las técnicas moleculares para la determinación de la CVP es menor de 0,3 $\log_{10}$, por tanto cualquier resultado con una diferencia mayor de 0,2-0,3 $\log_{10}$ (equivalente al doble o la mitad en valor absoluto) se considera significativo desde un punto de vista téc-

nico. La mayoría de los pacientes infectados que no reciben tratamiento tienen una CVP detectable en un rango muy amplio. Hay que considerar también que para confirmar un fracaso virológico, se debe confirmar éste con una segunda determinación.

3.4.1. Respuesta al tratamiento y fracaso virológico

Los criterios de respuesta y fracaso virológicos siguiendo la guía de GESIDA son:

- Respuesta virológica: reducción de la CVP superior a $1 \log_{10}$ tras 4 semanas desde el inicio del TAR y CVP menor de 50 copias/mL tras 16-24 semanas de iniciado el TAR.
- Fracaso virológico: corresponde a cualquiera de las siguientes situaciones: a) CVP detectable tras 24 semanas del inicio del TAR; b) si tras alcanzar la CVP indetectable, ésta vuelve a ser superior a 50 copias/mL en dos determinaciones consecutivas (separadas por 2-4 semanas). En pacientes con CVP muy elevadas (más de 300.000 copias/mL) pueden requerirse más de 24 semanas para obtener una CVP indetectable.

El fracaso virológico obliga a considerar distintos factores: falta de adherencia al tratamiento, errores en la dosificación, interacciones medicamentosas o alimentarias, problemas de malabsorción o desarrollo de mutaciones de resistencias a los fármacos ARV.

3.4.2. Factores que aumentan la CVP

Además de la progresión natural de la infección, la CVP puede aumentar rápidamente en situaciones en las que se produce un estímulo inmunológico que aumenta la producción de partículas víricas por los linfocitos infectados. Si la medida de la CVP se efectúa tras un proceso infeccioso intercurrente o vacunación puede haber elevaciones transitorias. El tratamiento de algunas coinfecciones como tuberculosis, malaria, herpes, sífilis o gonorrea podrían reducir los niveles de CVP.

3.4.3. Interpretación de viremias bajas

En un 15-30% de pacientes con CVP indetectable se detectan ocasionalmente episodios asilados y transitorios de viremia de bajo nivel (inferior a 500 copias/mL) denominados *blips*. Esta viremia vuelve espontáneamente a ser inferior a 50 copias/mL sin ningún cambio en el TAR. Los *blips* podrían estar causados por la replicación del VIH-1 en reservorios, fluctuaciones biológicas, o errores en el procesamiento, y no parecen tener especial relevancia clínica. Las nuevas

técnicas moleculares para determinar la CVP permiten detectar una proporción importante de pacientes con niveles de CVP comprendidos entre 20 y 50 copias/mL, además de otros con viremia detectable pero no cuantificable (<20 copias/mL). Distintos autores han indicado que esta viremia de bajo nivel cuando se detecta de forma persistente se asocia con un mayor riesgo de fracaso virológico. Aunque estos estudios, por su carácter retrospectivo, han comparado pacientes con distintas características (nivel de CD4, tiempo previo de supresión virológica o uso de ITINANs), lo que sí es evidente es que en todos ellos, incluso utilizando diferentes ensayos de determinación de carga viral, se reproducen los resultados. Los autores de estos estudios concluyen, de forma unánime, sobre la necesidad de estudios de intervención que confirmen sus resultados.

Además, algunos pacientes pueden presentar fracaso inmunológico, es decir, que no presentan una cifra adecuada de linfocitos CD4+ a pesar de mantener una CVP inferior a 50 copias/mL. En estos casos tampoco se recomienda modificar el TAR, con la excepción de ciertas combinaciones.

3.4.4. CVP indetectable en pacientes infectados pero sin tratamiento

Algunos pacientes infectados (5-7%), después del pico de viremia intensa correspondiente a la infección aguda, pueden mantener la replicación del virus controlada por periodos prolongados en ausencia de tratamiento antirretroviral. En estos casos, la CVP puede ser indetectable durante meses. Esta situación, aunque poco frecuente, es normal y suele ocurrir en pacientes con diagnóstico de certeza de infección, que se encuentren asintomáticos y con cifras de linfocitos CD4 normales. En un paciente con infección por el VIH diagnosticada por serología, que está sintomático o tiene las cifras de linfocitos CD4 disminuidas y que no recibe tratamiento antirretroviral, una CVP indetectable debería hacer sospechar una variante no detectada por la técnica (VIH-1 grupo O, grupo N, variantes genéticas del grupo M ó VIH-2); esta situación se debe resolver por técnicas serológicas y moleculares específicas.

4. PRUEBAS PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIAS Y TROPISMO VIRAL

Las pruebas para la detección de resistencias a antirretrovirales pueden clasificarse en dos tipos: genotípicas o fenotípicas. Los métodos genotípicos determinan las

mutaciones en la secuencia primaria de nucleótidos del gen del VIH objeto de estudio comparándola con la secuencia de una cepa salvaje. La resistencia fenotípica se expresa en términos de concentración de fármaco necesario para inhibir la replicación vírica en cultivo celular. Generalmente se expresa en términos de CI_{50} , indicando la concentración de fármaco requerida para reducir al 50% la producción viral *in vitro*. La interpretación de estos valores es diferente dependiendo del fármaco implicado.

4.1. TÉCNICAS GENOTÍPICAS E INTERPRETACIÓN DEL GENOTIPO

La secuenciación de ácidos nucleicos es el método genotípico de referencia para la determinación de la resistencia del VIH a los fármacos antirretrovirales. Se obtiene información completa de la secuencia de la región del genoma viral amplificada previamente por PCR, empleando *primers* o dideoxynucleótidos marcados de forma diferente para poder distinguirlos entre sí. Para ello, el método más utilizado es el *método enzimático*, también llamado de síntesis abortiva, de los dideoxynucleótidos, o secuenciación tipo Sanger, que utiliza la secuenciación unidireccional. Del mismo modo pueden marcarse los cebadores o primers y entonces se denomina secuenciación bidireccional. Por cualquiera de los dos métodos, el resultado es una secuencia de nucleótidos que, una vez editada, se traduce en una secuencia de aminoácidos. Esta secuencia de aminoácidos se compara entonces con la de una cepa de referencia del VIH con el fin de determinar si existen mutaciones. Así se analizan principalmente las secuencias de la retrotranscriptasa (RT), proteasa e integrasa, en busca de mutaciones que confieran resistencia al tratamiento. En la actualidad hay equipos de secuenciación asistidos por ordenador, que automatizan los pasos de electroforesis, detección y análisis de las bandas de secuenciación (patrones de picos llamados *electroferogramas*), y el ensamblaje de los fragmentos secuenciados. Dicha automatización ha permitido:

- Obtener una mayor sensibilidad de detección.
- Secuenciar fragmentos de hasta 700-800 pares de bases (en el caso que nos ocupa esto es insuficiente y hay que recurrir a varias reacciones de secuenciación para poder estudiar todas las posiciones del gen *pol* relacionadas con resistencia).
- Tener menor cantidad de paradas inespecíficas de la ADN polimerasa por las estructuras secundarias en el ADN molde.

- Analizar los resultados más rápidamente y reducir el tiempo de procesamiento de las muestras, lo que permite disminuir el tiempo de respuesta para emisión de resultados.

Todo ello ha contribuido a generalizar el uso de la técnica en concreto para la detección de mutaciones de resistencia a fármacos, en éste caso frente a antirretrovirales.

Los ensayos de secuenciación comerciales más utilizados han sido TRUGENE™ HIV-1 Genotyping Test (Siemens NAD) y ViroSeq™ HIV genotyping system (Abbott Diagnostics). El primero utiliza la secuenciación bidireccional y la electroforesis en gel, y permite investigar mutaciones en la RT y la proteasa; el segundo emplea el método unidireccional y la electroforesis capilar, y permite investigar mutaciones en la RT, proteasa e integrasa. Ambos sistemas ofrecen un *software* para la edición de las secuencias y un algoritmo propio de interpretación. Se han realizado varios estudios comparativos que no establecen grandes diferencias en cuanto a ambas técnicas.

Debido a que es difícil tener un profundo conocimiento de la significación clínica de todas las mutaciones, los ensayos genotípicos se suelen acompañar de una interpretación de las mutaciones encontradas. Es en este punto, en la interpretación, cuando se acaba la reproducibilidad interlaboratorio. El elevado número de mutaciones de resistencia y la existencia de interacciones entre ellas son algunas de las causas de los problemas en la interpretación. Afortunadamente, el modelo para la interpretación de las mutaciones de resistencia es susceptible de ser informatizado, porque los resultados de los tests genotípicos se obtienen en formato de texto (una lista de nucleótidos) y porque las reglas de interpretación son fácilmente computarizables. Por esto, hoy en día la interpretación de las mutaciones de resistencia se hace principalmente sobre la base de algoritmos informáticos, en los que se introduce la secuencia nucleotídica de la proteasa y retrotranscriptasa de VIH y se compara con la secuencia de una cepa patrón sin ninguna mutación (cepa salvaje o *wild type*), reconociendo entonces las mutaciones de resistencia.

De hecho, el genotipo del VIH-1 interpretado por un conjunto de normas del *software*, predice la evolución virológica cuando se complementa con la información clínica como base para realizar un cambio de tratamiento. Existen numerosos sistemas para interpretar el genotipo obtenido mediante secuenciación: se han desarrollado más de 25 sistemas de interpretación

con amplias diferencias entre ellos en cuanto a base científica, validación clínica, etc. Algunos de ellos son listados de mutaciones asociadas con resistencia a modo de tablas y otros están disponibles en internet como la página de la Sociedad Internacional de SIDA de EEUU (<http://www.iasusa.org/>), o la base de datos para secuencias de proteasa, transcriptasa inversa e integrasa de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>).

Todos son fácilmente accesibles, y presentan sistemas de interpretación sencillos para todos los fármacos disponibles. Sin embargo, en ninguno de los documentos de consenso o paneles de expertos se emiten normas sobre cuál debe ser la forma de interpretar los resultados de las pruebas genotípicas. Es más, cuando se comparan los algoritmos entre sí existen serias discrepancias entre ellos. En España, disponemos del algoritmo de la Red de Investigación en SIDA, que se actualiza periódicamente y está disponible en www.retic-ris.net.

Finalmente, hay que destacar que se debe interpretar el resultado de las pruebas de resistencia teniendo en cuenta la historia previa de tratamiento antirretroviral y, en su caso, estudios previos de resistencias que se hayan realizado al mismo paciente, intentando disponer del genotipo acumulado.

4.2. TÉCNICAS FENOTÍPICAS E INTERPRETACIÓN DEL FENOTIPO

Los estudios fenotípicos tienen la ventaja de valorar con mayor fidelidad la sensibilidad del virus frente a cada fármaco, y según este grado de sensibilidad se podría valorar en un futuro la posibilidad de sobrepasar la resistencia aumentando los niveles plasmáticos del fármaco. Sin embargo, los estudios fenotípicos deben considerarse por el momento como poco viables, principalmente por la complejidad, laboriosidad de la técnica y el tiempo necesario para la emisión de resultados. Esto ha provocado que queden limitados a métodos que utilizan virus recombinantes, y que sólo se realizan en laboratorios especializados de investigación y/o de casas comerciales. Los tres ensayos de virus recombinantes que se comercializan son: Anti-virogram (Tibotec-Virco), Phenosense™ (Virologic) y Phenoscript™ (Viralliance-SAS).

Existen distintos puntos de corte para la interpretación del fenotipo: técnico, biológico y clínico.

a. El punto de corte técnico se establece en base a la

reproducibilidad del ensayo: sólo nos informa si la CI_{50} de la cepa en estudio difiere significativamente de la de la cepa patrón; por lo tanto no proporciona información sobre la relación existente con la posibilidad o no de una respuesta clínica al antirretroviral en estudio.

- b. El punto de corte biológico se basa en la media de la CI_{50} de cepas aisladas de pacientes *naïve* y para cada antirretroviral. Este punto de corte se estableció en dos desviaciones estándar por encima de la media de CI_{50} de dichas cepas; este punto de corte es una buena medida de la sensibilidad a los antivirales del virus en estudio con respecto a los que circulan en la población no tratada e infectada por VIH pero tampoco proporciona ninguna medida en relación con si un tratamiento será efectivo o no.
- c. El punto de corte clínico se establece en base a la correlación de la CI_{50} a un antirretroviral con la respuesta clínica medida en términos de descenso de la carga viral en un determinado período de tiempo; es el punto de corte ideal, pero la realidad es que no siempre existe una relación binaria resistencia-falta de respuesta, sino que esto más bien es un fenómeno continuo, por lo que se hace necesario definir intervalos que definan varias posibilidades de respuesta.

La dificultad de la interpretación de las pruebas fenotípicas radica en la dificultad de diseñar ensayos clínicos que avalen los puntos de corte clínicos de cada antirretroviral. Además, un problema añadido puede ser la variabilidad que a esto pueda aportar el tipo de ensayo fenotípico que se realice.

4.3. PREDICCIÓN DEL FENOTIPO A PARTIR DEL GENOTIPO: FENOTIPO VIRTUAL

El fenotipo virtual es la principal herramienta en este campo. Diseñado por Virco, ha sufrido diversas modificaciones/actualizaciones. A partir de 2005 se ha redefinido, recibiendo la nueva actualización el nombre de vircoType HIV-1: su mayor novedad es que incorpora nuevos puntos de corte, que en esta versión son clínicos, y además define la resistencia a un fármaco de un modo continuo, en vez de hacer una interpretación dual. Asimismo, incorpora información sobre la resistencia a inhibidores de la proteasa potenciados con ritonavir y, en determinados casos, incluye el consejo de expertos en la interpretación final. La potencia de esta herramienta para la interpretación viene avalada por el número de series genotipo-fenotipo-respuesta virológica de que dispone.

Existen otras herramientas que predicen el fenotipo a partir del genotipo, como geno2pheno (<http://www.geno2pheno.de>).

4.4. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL TROPISMO VIRAL

La definición de tropismo viral en el VIH no ha sido desde su inicio un concepto fijo, sino que ha tenido que ver progresivamente con el efecto citopático (IS/NIS), con la cinética de replicación (RB/RAR) o con la facultad de infectar a diferentes líneas celulares (M/T o D-trópicas) hasta llegar a la definición actual, basada en la capacidad que tiene el virus de utilizar un determinado correceptor, como los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, para poder entrar en la célula diana, lo cual ha permitido clasificar a los aislados virales en variantes R5-trópicas, X4-trópicas y Dual Mixtas (D/M) en función del correceptor utilizado.

En estos últimos años, los estudios de tropismo han adquirido un especial interés debido principalmente al diseño de fármacos antirretrovirales destinados a bloquear estos receptores de quimiocinas. La aprobación de los antagonistas de CCR5, que como el maraviroc (MVC) presentan actividad específica frente a las variantes R5-trópicas ha generado la necesidad de disponer de ensayos para la determinación del tropismo viral en aquellos pacientes candidatos a iniciar un tratamiento con este fármaco, ya que la detección de variantes X4-trópicas se ha asociado con el fracaso al tratamiento.

4.4.1. Métodos fenotípicos

Desde un principio, los ensayos utilizados para la determinación del tropismo viral han sido de índole fenotípica y están basados principalmente en la generación de virus recombinantes a partir de la envuelta del virus del paciente (ESTA-Trofile, Tropitest, Toulouse Tropism Test, etc), en la combinación de métodos genotípicos y fenotípicos (Virco type HIV-1, PhenoX-R, HIV-1 Phenoscript Env, etc) y finalmente en el cocultivo a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del paciente con distintas líneas celulares como U87 (Trocai) que pueden expresar uno o más correceptores de CD4 o las clásicas MT2 para determinar el efecto citopático viral. Estos ensayos constituyen todavía el método de referencia para caracterizar el tropismo viral por su gran sensibilidad para detectar las variantes minoritarias CXCR4 y/o CCR5 en los subtipos B y no-B del VIH-1 y además representan el único método para medir la resistencia a los antagonistas de CCR5. Sin embargo, este tipo de ensayos presentan, ade-

más de un precio elevado, complicaciones técnicas y en especial logísticas que dificultan su utilización en la práctica clínica.

4.4.2. Métodos genotípicos

En este contexto, los métodos genotípicos, basados en el análisis por secuenciación de la tercera región variable (V3) de la glicoproteína de la envuelta gp120 del VIH-1, se presentan frente a los ensayos fenotípicos, como una alternativa más económica, rápida y factible de desarrollar en cualquier laboratorio de virología que cuente con tecnología para realizar estudios genotípicos de secuenciación.

En este sentido, para las variantes virales R5 y X4-trópicas, la secuencia de aminoácidos de la región V3 de gp120 determina en gran medida el uso preferencial de CCR5 y/o CXCR4. Aunque conviene reseñar, que otras regiones de la envuelta como V1/V2 y C4 también parecen estar implicadas en este proceso. A este respecto, se han descrito desde un principio diferentes reglas y algoritmos para la predicción del tropismo viral (R5, X4) que se fundamentan en las características de la secuencia de aminoácidos de dicha región. Entre estas reglas encontramos la regla 11/25 basada en la presencia de aminoácidos básicos en estas posiciones, la regla de la carga neta en V3 y, por último, la combinación de ambas reglas que clasifica una variante como X4 siempre y cuando una de ellas lo haga. Con posterioridad, el estudio de la variabilidad natural en las secuencias de V3 y su asociación con los fenotipos R5 o X4-trópicos, ha permitido la identificación de nuevos residuos y patrones de aminoácidos relacionados con el tropismo viral y también el desarrollo de diferentes bases de datos con información genofenotípica de los aislados virales. A partir de estas bases y a través de la utilización de diferentes métodos estadísticos (*support vector machine*-SVM, *position specific scoring matrices*-PSSM) se han diseñado algoritmos bioinformáticos que permiten predecir el uso del correceptor basándose en la secuencia genética completa de la región V3 de un determinado aislado viral. La mayoría de estos algoritmos, se encuentran disponibles en páginas webs de libre acceso (WetCat, WebPSSM, FortinbrasPSSM y Geno2pheno).

Los primeros estudios de correlación entre métodos genotípicos y fenotípicos mostraron, en general, una baja sensibilidad de los primeros para la detección de variantes X4-trópicas. En general los ensayos genotípicos basados en la secuenciación poblacional presentan limitaciones técnicas a distintos niveles (proceso de retrotranscripción, región estudiada, bases

de datos del algoritmo de interpretación) pero especialmente destaca su baja sensibilidad para detectar variantes minoritarias presentes por debajo del 20% de la población viral que marca la diferencia con los métodos fenotípicos. Los esfuerzos realizados inicialmente para solucionar estas limitaciones incluyeron la mejora en el diseño y uso de los algoritmos así como el incremento de secuencias con información fenotípica en las bases de datos utilizadas. Estas mejoras han permitido la validación clínica de las herramientas genotípicas al demostrar que estas son comparables en la predicción de la respuesta a MVC y en la capacidad de identificar pacientes respondedores y no respondedores, a pesar de su menor sensibilidad para detectar variantes X4-trópicas respecto de los ensayos fenotípicos. No obstante, hay que considerar, en el panorama terapéutico actual, la contribución de los fármacos administrados junto a MVC para conseguir la supresión viral. Dentro de este contexto, la presencia de variantes X4-trópicas probablemente podría tener un impacto relativo en la respuesta virológica. Por todo esto, las diversas guías de manejo de la infección por VIH, como la española de GESIDA y la de la DHHS estadounidense, incluyen entre sus recomendaciones la posibilidad de determinar el tropismo del VIH-1 mediante métodos genotípicos para guiar el uso terapéutico de los antagonistas de CCR5.

Por último y dentro de las mejoras realizadas en los métodos genotípicos merece una especial atención la introducción paulatina de nuevas metodologías de genotipado como las plataformas de secuenciación masiva de última generación (454, Illumina, PacBio, Ion Torrent, etc) que reducen el coste para la determinación genotípica del correceptor del VIH-1, con un nivel de sensibilidad en la detección de variantes minoritarias comparable al de los ensayos fenotípicos. Sin embargo, hasta que estas plataformas simplifiquen su logística y la interpretación bioinformática de resultados, los métodos para la determinación genotípica del tropismo viral basados en la secuenciación directa se presentan hoy en día como la principal alternativa rápida, fiable y factible de realizar en laboratorios de virología asistencial para la determinación del tropismo viral en la práctica clínica y para guiar el uso terapéutico de los antagonistas de CCR5, como el MVC. A este respecto y como ayuda al microbiólogo hay publicado un documento de consenso y su correspondiente actualización de 2011 para la determinación genotípica del tropismo del VIH en la práctica clínica. En él se recogen tanto recomendaciones sobre las indicaciones clínicas en pacientes *naïve* y pretratados, como de tipo técnico (PNT con volumen de partida, número de RT-PCRs, determinación

en ADN proviral, plataforma de secuenciación, análisis de calidad de las secuencias, expansión e interpretación de las secuencias, etc) que continúan estando vigentes a pesar del tiempo transcurrido.

4.5. LIMITACIONES DE LOS TESTS DE RESISTENCIA

En la actualidad, la mayoría de las pruebas genotípicas o fenotípicas incluyen durante su realización la extracción del ARN viral y su posterior retrotranscripción en ADN. De este ADN se amplifica la región genómica que se desea investigar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los procedimientos de extracción y amplificación son cruciales para el posterior análisis del amplificado y la calidad de los resultados dependerá directamente de la calidad de estas dos etapas del proceso. En todos los ensayos descritos hasta la fecha se amplifican la proteasa y parte de la RT del VIH y, en algunos se amplifica también un fragmento del gen *gag*. Las técnicas de las que disponemos aseguran un 98-100% de éxito en la amplificación en muestras con una carga viral superior a 500-1000 copias/mL. No obstante, con las adecuadas modificaciones es posible amplificar prácticamente cualquier muestra con carga viral detectable, es decir, con más de 50 copias/mL, y estudios recientes han demostrado la utilidad clínica de la determinación de resistencias en pacientes con viremia de bajo nivel, incluso por debajo de 200 copias/mL. Los ensayos están por lo general bien diseñados y para la PCR inicial se utilizan regiones dentro de los genes *gag-pol* altamente conservadas entre los subtipos distintos del B, ya sean no-B, URFs (*Unique Recombinant Forms*) o CRFs (*Circulating Recombinant Forms*).

Por otra parte, ninguno de los métodos genotípicos o fenotípicos asegura la detección de todas las variantes o cuasiespecies virales en el paciente infectado por el VIH. La mayoría de las técnicas sólo detectan una variante si ésta representa más del 20% del total de la población. Para asegurar la detección de las variantes que representan menos del 20%, también llamadas variantes minoritarias, es necesario recurrir a técnicas especiales (clonación de los productos de amplificación, PCR mediante diluciones al límite, o PCR a tiempo real) que son de difícil implantación en la rutina del laboratorio de secuenciación del VIH. Este hecho explica por qué los métodos que se utilizan actualmente predicen el fracaso de un fármaco pero no aseguran el éxito ya que las variantes minoritarias pueden ser portadoras de mutaciones de resistencia y seleccionarse mediante el empleo de ese fármaco en concreto.

Sin embargo, la reciente introducción de métodos de secuenciación de nueva generación, conocidos como técnicas de secuenciación masiva (UDS), que permiten la detección de mutaciones de resistencia presentes hasta en el 0,5% de la población total, y que han demostrado su utilidad clínica, sobre todo en pacientes que van a iniciar su primera línea de tratamiento, abren una posibilidad a su implantación en la rutina asistencial. Además al tratarse de técnicas de secuenciación de genomas únicos se puede obtener el dato de carga mutacional, porcentaje de la mutación con respecto a la carga viral, que está demostrando su utilidad como verdadero parámetro en la interpretación de las resistencias. En la actualidad existen varias plataformas de UDS disponibles, que se diferencian fundamentalmente en la longitud de las lecturas generadas y en la química de la secuenciación. En estos momentos, la plataforma Roche 454 es la única que ofrece un prototipo de equipo comercial para uso en la rutina asistencial. Con estos nuevos secuenciadores el coste de cada nucleótido pasó desde los 10 USD en 1990 a 0,01 USD en 2012. La secuenciación masiva, aplicada a las resistencias del VIH, ha demostrado su utilidad para la elección del mejor régimen de tratamiento de inicio basado en no análogos de nucleósidos. Recientemente, también se han presentado algunos datos sobre su utilidad para la elección de un nuevo régimen en los pacientes que ya han fracasado a varias líneas de tratamiento. No obstante, el gran inconveniente de esta técnica, hasta el momento, es la falta de automatización. Aunque se están desarrollando sistemas para poder automatizar las diferentes etapas, mientras esto no se resuelve hay que decir que actualmente son técnicas muy manuales y laboriosas, consumen mucho tiempo y requieran de personal altamente cualificado, por lo que hoy en día estas plataformas son poco operativas en el laboratorio de rutina.

4.6. INDICACIONES

En este apartado se expondrán las recomendaciones más recientes a nivel nacional (GESIDA/Plan Nacional del SIDA, Enero 2014) e internacional (*Department of Health and Human Services*, DHHS, Mayo 2014) que estos grupos de expertos realizan para conseguir una óptima utilización de las pruebas de resistencia.

Los escenarios para la utilización de las pruebas de resistencia son:

- a. Pacientes sin tratamiento previo: se debe realizar un test de resistencias en todos los pacientes en el momento del diagnóstico (GESIDA, AI; DHHS,

AI), además de repetirlo en el momento de iniciar tratamiento si este se difiere (GESIDA, AI; DHHS, CIII). Se han de investigar mutaciones transmitidas en la integrasa viral sólo en aquellos casos en los que exista una alta sospecha (DHHS, CIII). Se debe realizar un test genotípico para estimar el tropismo viral en aquellos casos en los que se vaya a iniciar tratamiento con un antagonista de CCR5 (DHHS, AI).

- b. Paciente con tratamiento antirretroviral: recomendar en todo fracaso al TAR (GESIDA, AI; DHHS, AI), para determinar el papel de la resistencia en el fracaso y diseñar un nuevo régimen con el mayor número de fármacos activos. Se han de investigar mutaciones de resistencia en la integrasa viral sólo en aquellos casos en los que se fracasa a un inhibidor de la integrasa (DHHS, CIII). Se debe realizar un test genotípico para estimar el tropismo viral en aquellos casos en los que se vaya a iniciar tratamiento con un antagonista de CCR5 (DHHS, AI). La DHHS recomienda realizar estudios de resistencia por encima de 500 copias/mL (BII).

Las guías de la DHHS recomiendan además la realización de los tests de resistencias en los casos en los que la supresión virológica tras iniciar tratamiento es subóptima (BIII) y en todas las mujeres embarazadas antes de iniciar tratamiento (AIII). Finalmente desaconsejan su empleo después de suspender un tratamiento (DIII), por la reversión de la mayoría de las mutaciones que no se detectarían al ser subpoblaciones minoritarias.

4.7. LOS ENSAYOS DE RESISTENCIA COMO HERRAMIENTA PARA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Como consecuencia de su alta diversidad genética el VIH-1 ha sido clasificado en 4 grupos (M, O, N y P) en base a la homología de secuencias genéticas completas o parciales. Mientras que los grupos O, N y P están restringidos principalmente a África Central, el grupo M es el responsable de la pandemia del VIH-1. De este modo, la mayoría de las cepas que circulan en España, al igual que en el resto del mundo, pertenecen a este grupo. Por su parte, la alta tasa de recombinación observada dentro del grupo M contribuye a incrementar su diversidad genética, dando lugar a una gran variedad de variantes. De acuerdo al análisis filogenético, estas variantes se clasifican en subtipos, subsubtipos e intersubtipos como las formas recombinantes circulantes (CRFs) y únicas (URFs). Hasta el momento han sido identificados 9

subtipos (A-D, F-H, J y K), 4 subsubtipos (A1, A2, F1 y F2), al menos 65 CRFs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=CRF65+and+HIV-1>) y múltiples URFs. La distribución geográfica de los subtipos del VIH-1 es desigual, así el subtipo B en el que se basan la mayoría de los estudios científicos sólo representa un 10% de las infecciones, sin embargo es el más prevalente en los países desarrollados incluyendo Europa Occidental y EEUU y de ahí su interés. El resto de subtipos y formas recombinantes que suelen agruparse como “subtipos no-B” han experimentado estos últimos años un incremento en su prevalencia en los países desarrollados como han puesto de manifiesto diferentes estudios de epidemiología molecular; en España su prevalencia se estima en torno a un 15% con incrementos significativos en la población nativa e inmigrante. Además de su interés epidemiológico, diferentes estudios han demostrado que la presencia de estos subtipos no-B puede ser relevante en aspectos clínicos al tener implicaciones en el diagnóstico, en la monitorización del tratamiento, en el diseño de vacunas, en la progresión de la enfermedad, en la actividad antiviral, en el incremento de resistencias a antirretrovirales o en la barrera genética para el desarrollo de las mismas, etc; de ahí la importancia de la correcta caracterización del VIH-1 en sus correspondientes subtipos B y no-B. En este sentido, el análisis filogenético es la técnica de referencia para el subtipado y discriminación entre subtipos y CRFs, sin embargo debido a su complejidad necesita de personal entrenado que deberá conocer e interpretar los resultados de los análisis obtenidos en los programas de filogenia (PHYMLIP software package, DNADIST, Clustal X, MEGA) y por esta razón no está implementado en la práctica habitual del laboratorio de virología clínica. De cara a facilitar la realización de análisis filogenéticos en la práctica del laboratorio, se han desarrollado varias herramientas de subtipado automático para el VIH-1 que usan las secuencias del gen *pol* obtenidas de los estudios genotípicos de resistencia y que se encuentran disponibles en diferentes webs (REGA, Standford, geno2pheno, NCBI, STAR, EuResist, TherapyEdge y jpHMM). Aunque son rápidas, fáciles de usar y muy útiles para la identificación del subtipo B, presentan el inconveniente de su menor sensibilidad para la discriminación entre los subtipos no-B, especialmente en las CRFs, con respecto al análisis filogenético convencional. Por lo que respecta al VIH-2 se han descrito 8 grupos (A-H) siendo los más frecuentes a nivel mundial el A y el B; hasta el momento sólo se ha descrito una única forma de CRF (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/Help-Docs/subtypes-more.html>).

5. PUNTOS CLAVE

5.1. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

- La detección de anticuerpos frente al VIH en plasma o suero se debe realizar con un inmunoensayo de screening o cribado que poseen una sensibilidad elevada y permite detectar la infección por los distintos grupos de VIH-1 y por VIH-2.
- Las muestras reactivas se deben confirmar siempre con un ensayo de especificidad superior, que realizará la diferenciación entre VIH-1 y VIH-2. Se recomienda emplear inmunoensayos de cuarta generación que detectan anticuerpos del paciente y antígeno p24 viral, que reduce el periodo ventana a 13-15 días. Ante la sospecha clínica de infección aguda o bien ante evidencia serológica es aconsejable realizar la determinación de la carga viral plasmática del VIH.
- El uso de pruebas rápidas está muy extendido, pero hay que poner especial atención a su lectura. Un resultado reactivo siempre hay que confirmarlo en un laboratorio de Microbiología.
- El algoritmo diagnóstico de la infección por el VIH debe permitir emitir un resultado positivo confirmado de forma rápida para contribuir a reducir la transmisión y no perder oportunidades de diagnóstico.

5.2. DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL

- La mayoría de las plataformas actuales emplean la PCR en tiempo real para cuantificar la carga viral plasmática (CVP).
- La CVP es el principal factor para la monitorización del tratamiento.
- Otras indicaciones son el diagnóstico de la infección aguda, diagnóstico de la transmisión materno-fetal y la valoración del riesgo de transmisión.
- Se suele realizar en plasma, si bien, también se puede emplear DBS, LCR, semen, muestras cervico-vaginales o tejidos.
- La comunicación del resultado de CVP se debe realizar en valor absoluto y escala logarítmica para facilitar su interpretación.
- Para países en vías de desarrollo, se están desarrollando sistemas “point of care” para la determinación de CVP.
- La CVP comunitaria sirve como herramienta epidemiológica para valorar el riesgo de transmisión de VIH.
- Cualquier nivel de CVP supone un riesgo para el posterior fracaso virológico.

5.3. DETERMINACIÓN DE RESISTENCIAS

- Los métodos genotípicos son los preferidos para la determinación de resistencias y para la estimación del tropismo
- Se pueden determinar resistencias en la transcriptasa reversa (RT), proteasa (Pro) e integrasa (INT).
- En los estudios de resistencias del VIH, la mayor variabilidad se produce a la hora de la interpretación.
- Las guías clínicas recomiendan la determinación de resistencias tanto en pacientes naïve (sólo RT y Pro) como en los fracasos.
- Se debe considerar la determinación del tropismo viral en aquellos pacientes en fracaso con indicación de tratamiento con una antagonista de CCR5.
- La complejidad de las técnicas de variantes minoritarias hacen que estas tecnologías, aunque han demostrado su utilidad clínica, por el momento sean poco accesibles a los laboratorios de rutina.
- Los estudios de resistencias aportan una información fundamental para conocer la epidemiología molecular del VIH.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez Estévez M, Chueca Porcuna N, Guillot Suay V, García F, Muñoz Medina L, Vinuesa García D, Parra Ruiz J, Hernández-Quero J, García García F. Quantification of viral loads lower than 50 copies per milliliter by use of the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test, version 2.0, can predict the likelihood of subsequent virological rebound to >50 copies per milliliter. *J Clin Microbiol*. 2013; 51:1555-1557.
2. Alvarez M, Chueca N, Guillot V, Bernal M del C, García F. Improving clinical laboratory efficiency: introduction of systems for the diagnosis and monitoring of HIV infection. *Open Virol J*. 2012;6:135-143.
3. Baleriola C, Johal H, Jacka B, Chaverot S, Bowden S, Lacey S, Rawlinson W. Stability of hepatitis C virus, HIV, and hepatitis B virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at -20°C and -70°C. *J Clin Microbiol*. 2011;49:3163-3167.
4. Bennett B, Neumann D, Fordan S, Villaraza R, Crowe S, Gillis L. Performance of the new HIV-1/2 Diagnostic Algorithm in Florida's public health testing population: A review of the first five months of utilization. *J Clin Virol* 2013; 58:29-33.
5. Branson BM, Stekler JD. Detection of acute HIV infection: we can't close the window. *J Infect Dis*. 2012; 205:521-524.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Criteria for laboratory testing and diagnosis of HIV: Approved Guideline. CLSI document M53-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
7. Diagnosis and management of acute HIV infection New York State Department of Health AIDS Institute. Disponible en: www.hivguidelines.org
8. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2014). Panel de expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida. Disponible en: <http://www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2014/gesida-guiasclinicas-2014-tar.pdf>
9. Doyle T, Smith C, Vitiello P, Cambiano V, Johnson M, Owen A, Phillips AN, Geretti AM. Plasma HIV-1 RNA detection below 50 copies/ml and risk of virologic rebound in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2012; 54:724-732.
10. García F, Álvarez M, Bernal C, Chueca N, Guillot V. Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29:297-307.
11. García F, Alvarez M, Fox Z, García-Díaz A, Guillot V, Johnson M, Chueca N, Phillips A, Hernández-Quero J, Geretti AM. Predicting antiretroviral drug resistance from the latest or the cumulative genotype. *Antivir Ther*. 2011;16:373-382.
12. García F, Palomares JC, Martínez NM, Alvarez M, Suarez S, García F, Rodríguez JM, Quero JH, del Carmen Maroto M. Study of different system for interpreting results of genotypic antiretroviral drug resistance tests. *Antiviral Therapy* 2003; 8:251-252.
13. Gökengin D, Geretti AM, Begovac J, Palfreeman A, Stevanovic M, Tarasenko O, Radcliffe K. 2014 European Guideline on HIV testing. *Int J STD AIDS*. 2014; Apr 22. . [Epub ahead of print].
14. Henrich TJ, Wood BR, Kuritzkes DR. Increased risk of virologic rebound in patients on antiviral therapy with a detectable HIV load <48 copies/mL. *PLoS One*. 2012; 7:e50065.
15. Iribaren JA, et al. Labarga P, Rubio R, Berenguer J, Miró JM, Antela A, González J, Moreno S, Arrabalaga J, Chamorro L, Clotet B, Gatell JM, López-Aldegue J, Martínez E, Polo R, Tuset M, Viciano P, Santamaría JM, Kindelán JM, Ribera E, Segura F; Grupo de Estudio de Sida; Consejo Asesor Clínico del Plan Nacional sobre el Sida del Ministerio de Sanidad y Consumo. Recomendaciones de GESIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en pacientes adultos infectados por el VIH (octubre 2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 564-642.
16. Laboratory Biosafety Manual. Third edition, World Health Organization, Geneva 2004.
17. Malloch L, Kadivar K, Putz J, Levett PN, Tang J, Hatchette TF, Kadkhoda K, Ng D, Ho J, Kim J. Comparative evaluation

- of the Bio-Rad Geenius HIV-1/2 Confirmatory Assay and the Bio-Rad Multispot HIV-1/2 Rapid Test as an alternative differentiation assay for CLSI M53 algorithm-I. *J Clin Virol*. 2013; 58 (Suppl 1):85-91.
18. Montaner JS, Lima VD, Barrios R, Yip B, Wood E, Kerr T, Shannon K, Harrigan PR, Hogg RS, Daly P, Kendall P. Association of highly active antiretroviral therapy coverage, population viral load, and yearly new HIV diagnoses in British Columbia, Canada: a population-based study. *Lancet*. 2010; 376:532-539.
 19. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. Disponible en <http://aidsinfo.nih.gov>. Mayo, 2014.
 20. Piwowar-Manning EM, Tustin NB, Sikateyo P, Kamwendo D, Chipungu C, Maharaj R, Mushanyu J, Richardson BA, Hillier S, Brooks Jackson J. Validation of rapid HIV antibody tests in 5 African countries. *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 2010; 9:170-172
 21. Poveda E, Paredes R, Moreno S, Alcamí J, Córdoba J, Delgado R, Gutiérrez F, Llibre JM, García Deltoro M, Hernández-Quero J, Pulido F, Iribarren JA, García F. Update on clinical and methodological recommendations for genotypic determination of HIV tropism to guide the usage of CCR5 antagonists. *AIDS Rev*. 2012; 14:208-217.
 22. Puren A, Gerlach JL, Weigl BH, Kelso DM, Domingo GJ. Laboratory operations, specimen processing, and handling for viral load testing and surveillance. *J Infect Dis*. 2010; 201 (Suppl 1):S27-S36.
 23. Rosenberg NE, Kamanga G, Phiri S, Nsona D, Pettifor A, Rutstein SE, Kamwendo D, Hoffman IF, Keating M, Brown LB, Ndalama B, Fiscus SA, Congdon S, Cohen MS, Miller WC. Detection of acute HIV infection: a field evaluation of the Determine® HIV-1/2 Ag/Ab Combo Test. *J Infect Dis*. 2012; 205:528-534.
 24. Ryscavage P, Kelly S, Li JZ, Harrigan PR, Taiwo B. Significance and clinical management of persistent low-level viremia and very-low-level viremia in HIV-1-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58:3585-3598.
 25. Salmona M, Delarue S, Delauguerre C, Simon F, Maylin S. Clinical evaluation of BioPlex 2200 HIV Ag-Ab, an automated screening method providing discrete detection of HIV-1, p24 antigen, HIV-1 antibody, and HIV-2 antibody. *J Clin Microbiol*. 2014, 52:103-107.
 26. Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:247-277.
 27. Smit PW, Sollis KA, Fiscus S, Ford N, Vitoria M, Essajee S, Barnett D, Cheng B, Crowe SM, Denny T, Landay A, Stevens W, Habiya Mbere V, Perriens JH, Peeling RW. Systematic review of the use of dried blood spots for monitoring HIV viral load and for early infant diagnosis. *PLoS One*. 2014; 9:e86461.
 28. Stekler JD, Swenson PD, Coombs RW, Dragavon J, Thomas KK, Brennan CA, Devare SG, Wood RW, Golden MR. HIV testing in a high-incidence population: is antibody testing alone good enough? *Clin Infect Dis*. 2009; 49:444-453.
 29. Van den Berk GE, Frissen PH, Regez RM, Rietra PJ. Evaluation of the rapid immunoassay determine HIV 1/2 for detection of antibodies to human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3868-3869.
 30. WHO/UNAIDS Technical Update on HIV incidence assays for surveillance and epidemic monitoring. 2013. www.unaids.org/

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico serológico de la infección por el VIH	PNT-VIH-1	
		Edición N° 01	Página 1 de 4

PNT-VIH-01

Diagnóstico serológico de la infección por el VIH

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N° ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico serológico de la infección por el VIH	PNT-VIH-1	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la determinación de marcadores serológicos del VIH en muestras de suero mediante métodos de cribado y confirmación. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen seguimiento de pacientes infectados por el VIH o envíen muestras a laboratorios de referencia.

2. FUNDAMENTO

Las pruebas de determinación de marcadores de infección por el VIH deben adaptarse a los objetivos que se persigan. En este documento se denominan pruebas diagnósticas a las que se emplean de forma individualizada en el suero de una persona de acuerdo con los principios clínicos del consentimiento informado. Su utilidad deriva de su capacidad para detectar o descartar la infección por el VIH. Cuando las pruebas se aplican en virtud de criterios de seguridad biológica o vigilancia epidemiológica las estrategias de empleo difieren. Las características operacionales de las mismas deben valorarse en función del contexto de aplicación y en función de los objetivos que se pretenden se establecerá la elección de la técnica apropiada.

a. Técnicas de inmunoensayo para el cribado:

- Inmunoensayo de tercera generación. Para detectar anticuerpos emplean como soporte péptidos recombinantes/sintéticos del VIH-1 y VIH-2 y antígenos del VIH-1 del grupo O.
- Inmunoensayo de cuarta generación. Se emplean como soporte tanto péptidos recombinantes/sintéticos del VIH-1 (incluyendo el grupo O) como anticuerpos para detectar antígeno p24, reduciéndose el tiempo de detección en el período ventana.

b. Técnicas de confirmación:

- Estas técnicas han de confirmar y diferenciar anticuerpos del VIH-1 y el VIH-2. Entre los más usados están los diversos formatos de Western Blot (WB) que han ido apareciendo en el mercado, y el inmunoensayo en línea (LIA). Ambas técnicas pueden llevar antígenos de envoltura del VIH-2, para poder diagnosticarlo. Sin embargo, existen otros ensayos que son capaces de confirmar y diferenciar anticuerpos del VIH-1 y el VIH-2, y que consiguen resultados positivos días o semanas antes que el WB.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimientos relacionados con la recepción y registro de muestras.
- Procedimientos relacionados con higiene y seguridad en el procesamiento.
- Manuales de instrucciones de los sistemas diagnósticos.

4. MUESTRAS

Todos los laboratorios que realicen diagnóstico serológico de anticuerpos frente al VIH deben respetar las normas de seguridad de nivel 2. Las muestras de origen humano se deben considerar y manipular como potencialmente infecciosas. En todos los procesos llevados a cabo es necesario utilizar guantes y eliminar los residuos, reactivos y muestras en contenedores de seguridad para su eliminación posterior siguiendo las normas de productos biológicos infecciosos. Se han desarrollado directrices de buenas prácticas de laboratorio y, si se respetan, se puede garantizar la seguridad y mantener al mínimo los accidentes de laboratorio.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico serológico de la infección por el VIH	PNT-VIH-1	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

La muestra adecuada para la determinación de marcadores de infección por el VIH es el suero. Las condiciones para la para la recogida y el transporte de la muestra deben contemplar:

- Centrifugar el tubo de sangre a 1000-1500xg (generalmente equivale a 2000-2500 rpm) durante 10 minutos.
- Se precisa de una correcta y minuciosa identificación de los pacientes y sus muestras, comprobar el etiquetado con sus volantes correspondientes y guardar la confidencialidad en todo el proceso hasta que la muestra llegue al laboratorio para su procesamiento. Los laboratorios que reciben y almacenan gran cantidad de sueros deben mantener un sistema de recepción y registro de muestras controlado para evitar errores.
- Para su transporte las muestras se deben preparar y etiquetar de acuerdo con las normas vigentes en el transporte de sustancias infecciosas. Se pueden enviar entre 2°C y 8°C refrigeradas con hielo, o con nieve carbónica a una temperatura igual o inferior a -20°C.
- Para minimizar las contaminaciones microbianas que podrían alterar las muestras se recomienda no prolongar la conservación entre 2-8°C más allá de 7 días. Si se prevé un periodo de almacenamiento más prolongado es necesario la congelación a -20°C o -80°C. Se recomienda no someter las muestras a múltiples ciclos de congelación y descongelación.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Se utilizarán los reactivos, controles y calibradores propios de cada determinación. No se utilizarán materiales de dudosa procedencia o conservación ni aquellos que hayan superado su fecha de caducidad.

6. APARATOS Y MATERIAL

Deberán utilizarse las plataformas adecuadas para cada técnica siguiendo las indicaciones de cada fabricante.

Se utilizará también material general de laboratorio tanto inventariable como fungible.

7. PROCEDIMIENTO

Existen diversos métodos comerciales para la determinación de marcadores de infección por el VIH que han sido aprobados por la OMS y la UE para esta aplicación. Recomendamos por tanto seguir el protocolo y las indicaciones que proporcionan las compañías fabricantes. Las estrategias de cribado y confirmación aconsejan el seguimiento de protocolos que se pueden consultar en la versión desarrollada en el documento científico de este procedimiento. Los ensayos de cribado identifican las muestras reactivas y deben tener una sensibilidad superior, y los ensayos de confirmación permiten conocer si las muestras reactivas con un ensayo de cribado, contienen anticuerpos específicos para el VIH-1/2 y deben tener una especificidad superior.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se expresan en términos cualitativos de positivo o negativo. Se recomienda disponer de una técnica de cribado de anticuerpos frente al VIH y utilizar un método de confirmación para confirmar y diferenciar anticuerpos del VIH-1 y VIH-2.

Del conjunto de pruebas realizadas deberá resultar la emisión de un diagnóstico claro y concluyente, o bien la formulación de recomendaciones precisas para el seguimiento y diagnóstico definitivo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico serológico de la infección por el VIH	PNT-VIH-1	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Las pruebas están basadas en distintos principios técnicos que han ido evolucionando con el tiempo, la experiencia adquirida y las recomendaciones nacionales e internacionales. A pesar de los avances logrados en el desarrollo de las mismas se siguen produciendo casos de falsos positivos, y con menor frecuencia, de falsos negativos.

Estos errores deben ser minimizados y son atribuibles en parte al progresivo crecimiento de la demanda analítica en los ámbitos comunitario y hospitalario y pueden provocar situaciones que generan ansiedad en los pacientes y desconcierto en los profesionales responsables de la misma. La adopción de protocolos viables adaptados a la realidad de cada laboratorio pueden minimizar los errores del procedimiento.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones que se presentan con estas pruebas son similares a los de otras pruebas de diagnóstico serológico, aunque en este caso adquieren una importancia mayor por las posibles consecuencias y la trascendencia clínica de la infección.

Desde el punto de vista serológico en la infección por el VIH se producen cambios en la dinámica de producción de anticuerpos desde el momento de la seroconversión. El período ventana, con las actuales técnicas de inmunoensayo de cuarta generación, se acorta a aproximadamente dos semanas de duración. En los estadios finales de la infección pueden desaparecer los anticuerpos frente a algunas de las proteínas estructurales internas del VIH (p17, p24, p55) lo cual condiciona la ausencia de criterios de positividad en el WB, a pesar de existir una infección.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Criteria for laboratory testing and diagnosis of HIV: Approved Guideline. CLSI document M53-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
2. WHO/UNAIDS technical update on HIV incidence assays for surveillance and epidemic monitoring. 2013.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de la carga viral plasmática del VIH	PNT-VIH-2	
		Edición N° 01	Página 1 de 4

PNT-VIH-2

Detección de la carga viral plasmática del VIH

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N° **ASIGNADA A**

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de la carga viral plasmática del VIH	PNT-VIH-2	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica de la determinación de carga viral plasmática (CVP) del VIH-1 en muestras de sangre mediante amplificación de ácidos nucleicos.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen seguimiento de pacientes infectados por el VIH o a aquellos que envíen muestras a laboratorios de referencia.

2. FUNDAMENTO

Las actuales plataformas para la determinación de la CVP emplean PCR a tiempo real, previa extracción del ARN del VIH por métodos automatizados y posterior retrotranscripción a ADNc. Asimismo, realizan en paralelo una purificación y amplificación de un control interno que garantiza una cuantificación precisa.

La técnica de cuantificación consta de las siguientes fases:

1. Fase de extracción de ácidos nucleicos, a partir de muestras de plasma con EDTA. Estos equipos incorporan métodos de extracción automática del ARN.
2. Fase de retro-transcripción y amplificación. Todos ellos realizan una retrotranscripción previa del ARN del VIH-1 a ADNc, posteriormente se amplifica la diana con una PCR a tiempo real generándose moléculas fluorescentes que están ligadas a sondas oligonucleótidas que se unen específicamente al producto amplificado. Los primers empleados son específicos para una región altamente conservada del gen pol o gag. Cuando la fluorescencia excede una señal mínima en el ciclo umbral (Cycle threshold –Ct-), el número de ciclos de PCR que hayan transcurrido se usa para la cuantificación.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimientos relacionados con la recepción y registro de muestras.
- Procedimientos relacionados con higiene y seguridad en el procesamiento.
- Manuales de instrucciones de los sistemas diagnósticos.

4. MUESTRAS

La muestra adecuada para la determinación de la CVP del VIH-1 es plasma obtenido a partir de sangre anticoagulada con EDTA o citrato. Las condiciones para la recogida y el transporte, cuando sea necesario desde otros laboratorios al laboratorio de secuenciación son:

- Centrifugar el tubo Vacutainer a 2500 rpm. durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de las 6 horas siguientes a su recogida.
- En condiciones asépticas (se recomiendan pipetas Pasteur estériles), transferir 1,2 mL de plasma a criotubos con tapón de rosca de 2 mL de capacidad (3 ó 4 dependiendo del volumen de muestra). Identificar correctamente (iniciales del paciente, referencia en origen y fecha de extracción) los criotubos.
- Congelar inmediatamente a -70°C o en su defecto a -20°C. Mantener a -70°C para almacenamiento a largo plazo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de la carga viral plasmática del VIH	PNT-VIH-2	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Se utilizarán los reactivos, controles y calibradores propios de cada determinación. No se utilizarán materiales de dudosa procedencia o conservación ni aquellos que hayan superado su fecha de caducidad.

6. APARATOS Y MATERIAL

Deberán utilizarse las plataformas adecuadas para cada técnica siguiendo las indicaciones de cada fabricante.

Se utilizará también material general de laboratorio tanto inventariable como fungible.

7. PROCEDIMIENTO

Existen diversos métodos comerciales para la determinación de la CVP del VIH-1 que han sido aprobadas por la UE para esta aplicación. Recomendamos por tanto seguir el protocolo y recomendaciones que proporcionan los fabricantes. Para la extracción del ARN vírico también se propone emplear alguno de los métodos que los fabricantes recomiendan, ya que son los que han sido validados para el uso con dichos protocolos.

Muchas de estas técnicas requieren un alto volumen de muestra de partida por lo que en caso de tener que realizar diluciones por disponer de muestra insuficiente, se recomienda utilizar para ello suero fisiológico estéril o agua de biología molecular.

Se recomienda la suscripción a algún programa de control de calidad externo que permita garantizar la correcta realización de la técnica.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se expresan como copias/mL. Es recomendable ofrecer simultáneamente el equivalente en logaritmo decimal de la CVP por la frecuencia de recomendaciones que están basadas en esta escala.

En cada tanda de reacción se deben emplear controles positivos y negativos que aseguren el correcto funcionamiento de la técnica y la ausencia de contaminaciones, respectivamente.

Se recomienda no tener una demora en la emisión de resultados superior a 7 días.

En caso de emplear una muestra diluida se debe ajustar la cuantificación real y el límite de sensibilidad de la técnica.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología Molecular que los emite.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de la carga viral plasmática del VIH	PNT-VIH-2	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. Como recomendación general, deberán evitarse, en lo posible las manipulaciones innecesarias y extremarse las precauciones en el manejo de las muestras.

La exigencia tradicional de división de áreas para las técnicas de amplificación es mucho menos crítica para algunas de las técnicas actuales, fundamentalmente basadas en PCR en tiempo real, ya que no es necesario manipular el producto amplificado al realizarse todo el proceso de amplificación y detección en tubo cerrado.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En un paciente con infección por el VIH diagnosticada por serología, que está sintomático o tiene las cifras de linfocitos CD4 disminuidas y que no recibe tratamiento antirretroviral, una CVP indetectable debería hacer sospechar una variante no detectada por la técnica de VIH-1 o VIH-2.

Se pueden producir interferencias durante el proceso en muestras con restos de partículas, eritrocitos o coágulos de fibrina.

En situaciones, como extracciones de neonatos, en las que es imposible disponer de la cantidad de plasma establecida por la técnica se puede recurrir a procesar una cantidad menor con la consiguiente modificación del umbral de detección: por ejemplo, si se procesan 200 µL en lugar de 1 mL y el resultado es negativo debemos interpretar < 250 copias/mL en lugar de <20 copias/mL. De la misma manera se debe multiplicar cualquier resultado positivo por el factor de dilución, 5 en este caso, para normalizar la CVP a 1 mL.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez M, Chueca N, Guillot V, Bernal M del C, García F. Improving Clinical Laboratory Efficiency: Introduction of Systems for the Diagnosis and Monitoring of HIV Infection. *Open Virol J.* 2012;6:135-143.
2. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2014). Panel de expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida. Disponible en: <http://www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2014/gesida-guiasclinicas-2014-tar.pdf>
3. Griffith BP, Campbell S, Caliendo AM. Human Immunodeficiency Viruses. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology* 10th edition. Washington D.C. ASM Press. 2011; pp: 1302-1322.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a antirretrovirales y predicción del tropismo viral	PNT-VIH-3	
		Edición N° 01	Página 1 de 5

PNT-VIH-3

Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a antirretrovirales y predicción del tropismo viral

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N° ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a antirretrovirales y predicción del tropismo viral	PNT-VIH-3	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica de las fases preanalíticas y postanalíticas para la determinación de resistencias a antirretrovirales y para la predicción del tropismo viral en muestras clínicas mediante secuenciación de ácidos nucleicos.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología Clínica que realicen la detección de resistencias a antirretrovirales mediante técnicas genotípicas y a aquellos que envíen muestras a laboratorios de referencia.

2. FUNDAMENTO

Las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos permiten conocer la secuencia de bases de los genes *pol* (proteasa, integrasa y transcriptasa reversa) y *env* (gp41 y V3 de gp120) y además localizar los cambios de aminoácidos relacionados con la resistencia a los fármacos antirretrovirales y la predicción del tropismo viral.

En la técnica de secuenciación, el proceso completo consta de cuatro fases:

- **Fase de extracción de ácidos nucleicos**, a partir de muestras de plasma/suero.
- **Fase de retro-transcripción y amplificación**. El ARN liberado de las muestras es transcrito en cDNA y posteriormente se amplifica mediante el uso de primers específicos de las regiones (genes) correspondientes del genoma del VIH-1.
- **Fase de amplificación para detección proviral**. El ADN proviral se amplifica mediante el uso de primers específicos de las regiones (genes) correspondientes del genoma del VIH-1. Este procedimiento se reserva para investigación en muestras clínicas con cargas virales bajas o indetectables.
- **Fase de secuenciación**. El producto amplificado se somete a una nueva amplificación con concentraciones limitantes de dideoxynucleótidos (ddNTPs) marcados (secuenciación unidireccional) y con primers específicos (si estos son los que están marcados, entonces secuenciación bidireccional).
- **Fase de revelado**. Mediante el empleo de un secuenciador automático los amplificados purificados se resuelven mediante electroforesis capilar o vertical, obteniéndose un electroferograma con la secuencia de bases.

Finalmente, la secuencia de ácidos nucleicos se edita y se compara, mediante el empleo de un *software* específico o de programas de alineamiento de secuencias, con una secuencia de referencia y sin mutaciones.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimientos relacionados con la recepción y registro de muestras.
- Procedimientos relacionados con higiene y seguridad en el procesamiento.
- Manuales de instrucciones de los métodos comerciales utilizados.

4. MUESTRAS

Las muestras adecuadas para el estudio genotípico de resistencias son plasma o suero. Las condiciones para la recogida y el transporte, cuando sea necesario desde otros laboratorios al laboratorio de secuenciación son:

- Centrifugar el tubo Vacutainer a 2500 rpm. durante 10 minutos.
- En condiciones asépticas (se recomiendan pipetas Pasteur estériles), transferir 1 mL de plasma a criotubos con tapón de rosca de 2 mL de capacidad (3 o 4 dependiendo del volumen de muestra).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a antirretrovirales y predicción del tropismo viral	PNT-VIH-3	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

- Identificar correctamente (iniciales del paciente, referencia en origen y fecha de extracción) los criotubos.
- Congelar inmediatamente a -70°C o en su defecto a -20°C .
- Enviar al laboratorio de secuenciación dos alícuotas de cada paciente junto al volante de petición. El resto de alícuotas se conservan en el laboratorio de origen.
- En el momento de la recogida por la empresa de transportes, introducir dos alícuotas de cada paciente en un recipiente de seguridad biológica (SARSTEDT o similar), y este en un contenedor de poliestireno para envío refrigerado con hielo seco. Precintar y enviar.
- Nota. Debe efectuarse la separación del plasma en las 2-3 horas desde el momento de la extracción. La muestra se puede enviar sin congelar siempre que la recepción en el laboratorio de secuenciación se vaya a realizar en el mismo día de la extracción. En caso contrario es necesario congelarla en el laboratorio de origen.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Se utilizarán los reactivos, controles y calibradores propios de cada determinación. No se utilizarán materiales de dudosa procedencia o conservación ni aquellos que hayan superado su fecha de caducidad.

6. APARATOS Y MATERIAL

Deberán utilizarse las plataformas adecuadas para cada técnica siguiendo las indicaciones de cada fabricante. Se utilizará también material general de laboratorio tanto inventariable como fungible.

7. PROCEDIMIENTO

Existen diversos métodos comerciales para la realización de la técnica, que no se van a describir. Tan solo recomendamos ceñirse estrictamente al protocolo que proporcionan los fabricantes. Para la extracción del ARN viral también se propone emplear alguno de los métodos que los fabricantes recomiendan, ya que son los que han sido validados para el uso con dichos protocolos.

Además, existen métodos caseros o *in house* para la secuenciación de la proteasa, de la RT, de la integrasa y para la determinación genotípica del tropismo de VIH-1.

En ambos casos, y en especial cuando se empleen métodos caseros, se recomienda la suscripción a algún programa de control de calidad externo.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para la obtención de resultados se hacen, entre otras, las siguientes recomendaciones:

- Se necesitan secuencias bidireccionales de las regiones genómicas correspondientes donde se localizan las mutaciones asociadas a la resistencia antiviral (codones 10-94 de la proteasa, 41-236 de la RT, 66-263 de la integrasa, 36-138 de gp41 y 1-35 de V3 en gp120).
- Al editar la secuencia, es necesario revisar al menos todos los codones de resistencia. Es recomendable revisar también todos los cambios con respecto a la cepa salvaje elegida, y todas las posiciones en que existan diferencias entre la secuencia 5' y la 3'. Prestar especial atención a las mezclas (heterocigotos) y valorarlas especialmente cuando se presenten en ambas direcciones.
- La calidad de la secuencia se puede determinar en programas de libre acceso en internet (por ejemplo, <http://hivdb.stanford.edu/>).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a antirretrovirales y predicción del tropismo viral	PNT-VIH-3	
		Edición N° 01	Página 4 de 5

- Controlar las posibles contaminaciones entre muestras a la hora de la secuenciación, mediante el empleo de alguna herramienta que permita alinear la secuencia en estudio con todas las que se hayan realizado en el laboratorio (fingerprinting). Diferencias entre secuencias por debajo de 20 bases son indicativas de una posible contaminación. Este procedimiento permitirá además establecer vínculos epidemiológicos en la transmisión de cepas entre distintos pacientes.
- En el informe de resultados se debe proporcionar la lista de mutaciones asociadas a su correspondiente región, y un informe comprensible de la resistencia esperada a los distintos antirretrovirales, con indicación expresa de la fuente utilizada para la interpretación de las mutaciones de resistencia y su fecha de actualización. Para ello, se debe utilizar un algoritmo de reciente actualización. En la predicción del tropismo viral se indicará además del mismo la posibilidad de uso de los antirretrovirales disponibles.
- Se recomienda no tener una demora en la emisión de resultados superior a 15-20 días.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología Molecular que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. Para la realización de la técnica que se describe se deben tener en cuenta diversos aspectos estructurales, aplicables en general a todas las técnicas de amplificación. Para la secuenciación de ácidos nucleicos en general se precisan al menos tres zonas o áreas diferentes dentro del laboratorio: 1) La denominada “zona limpia” donde se prepararán los reactivos; 2) La zona para la preparación de la muestra (fase de extracción) y preparación de las mezclas de amplificación y de secuenciación; 3) el área para el manejo del material amplificado y/o secuenciado (fase de detección). En cada zona de trabajo debe existir un material (pipetas, puntas, batas de laboratorio, marcadores, etc.) específico de cada zona. Nunca se debe trasladar material entre zonas, salvo el estrictamente necesario y siempre en dirección 1 a 3. Como recomendación general, deberán evitarse, en lo posible las manipulaciones innecesarias y extremarse las precauciones tanto en lo referente al manejo de las muestras como a la dispensación de los reactivos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La sensibilidad de la técnica se ve disminuida en gran medida cuando se emplean muestras con carga viral <500-1000 copias/mL. Se pueden emplear métodos de concentración del ácido nucleico en el plasma y entonces se consiguen amplificar muestras con <500 copias/mL. Para pacientes tratados que no consiguen mantener una respuesta virológica sostenida, se puede utilizar la detección proviral de resistencias.

El objetivo de esta determinación es proporcionar una herramienta útil al clínico para diseñar un régimen de tratamiento antirretroviral: en este sentido hay que destacar que estos métodos no detectan variantes minoritarias y que por lo tanto no aseguran el éxito de un antirretroviral, sino que más bien predicen el fracaso.

El diseño del nuevo régimen mejora si la interpretación va acompañada del consejo de expertos, o si se ha realizado con un sistema experto que haya sido validado clínicamente.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a antirretrovirales y predicción del tropismo viral	PNT-VIH-3	
		Edición N° 01	Página 5 de 5

Estos métodos no son válidos para nuevas drogas hasta que se diseñan los algoritmos de interpretación y se validan clínicamente.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. García F, Aguilera A. Pruebas de resistencia. En: "Resistencia a los antirretrovirales 2005". Ed. Soriano V. Publicaciones Permmayer. 2005.
2. Kwok J, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339:237-238.
3. Panel on Clinical Practices for treatment of HIV infection. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov>. Mayo, 2014.
4. Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. Clin Microbiol Rev 2002; 15:247-277.