

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades  
Infecciosas y Microbiología Clínica

**6a.**

## **Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH**

**Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón**

**Coordinador: Juan Carlos López Bernaldo de Quirós**

**Autores: Rafael Delgado Vázquez**

**Federico García García**

**José María Eiros Bouza**

**Juan Carlos López Bernaldo de Quirós**

**Raul Ortiz de Lejarazu**



## **INDICE DEL DOCUMENTO CIENTIFICO**

### **1. Introducción**

### **2. Diagnóstico serológico**

- 2.1. Condiciones del laboratorio y precauciones con las muestras
- 2.2. Objetivos de las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH
- 2.3. Características operacionales de las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH
- 2.4. Pruebas de cribado de anticuerpos frente al VIH
- 2.5. Pruebas de confirmación de la presencia de anticuerpos frente al VIH
- 2.6. Estrategias de cribado y confirmación
- 2.7. Problemas en el cribado y confirmación. Algoritmo de decisión

### **3. Detección de la viremia plasmática del VIH (carga vírica plasmática –CVP-)**

- 3.1. Técnicas disponibles
- 3.2. Indicaciones
  - 3.2.1. Monitorización del tratamiento antirretroviral (ARV)
  - 3.2.2. Predicción de progresión en pacientes crónicamente infectados
  - 3.2.3. Valoración del riesgo de transmisión
  - 3.2.4. Diagnóstico de infección aguda
- 3.3. Obtención y manejo de las muestras
- 3.4. Carga vírica en LCR, semen y otros fluidos
- 3.5. Interpretación de los resultados
  - 3.5.1. Resultados y variabilidad
  - 3.5.2. Factores que aumentan la carga vírica plasmática (CVP)
  - 3.5.3. Episodios cortos de aumento de la CVP (*Blips*)
  - 3.5.4. CVP indetectable en pacientes infectados pero sin tratamiento
  - 3.5.5. Viremia detectable por debajo del umbral de 50 copias/mL

### **4. Detección de resistencias**

- 4.1. Técnicas genotípicas
  - 4.1.1. Secuenciación de ácidos nucleicos
  - 4.1.2. Otros ensayos genotípicos
  - 4.1.3. Interpretación del genotipo
- 4.2. Técnicas fenotípicas
  - 4.2.1. Método de sensibilidad del virus en células mononucleadas de sangre periférica (CMSP)
  - 4.2.2. Técnicas con virus recombinantes
  - 4.2.3. Interpretación del fenotipo
- 4.3. Predicción del fenotipo a partir del genotipo: fenotipo virtual
- 4.4. Indicaciones de las pruebas de resistencia
- 4.5. Limitaciones de las pruebas de resistencia

### **5. Bibliografía**

## **DOCUMENTOS TÉCNICOS**

**PNT-VIH-01.** Diagnóstico serológico de la infección por el VIH

**PNT-VIH-02.** Determinación de la carga vírica plasmática (CVP) del VIH-1

**PNT-VIH-03.** Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a antirretrovirales

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades  
Infecciosas y Microbiología Clínica

**Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón**

## **6a. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH. 2006**

**Coordinador: Juan Carlos López Bernaldo de Quirós**

**Autores: Rafael Delgado Vázquez  
Federico García García  
José María Eiros Bouza  
Juan Carlos López Bernaldo de Quirós  
Raul Ortiz de Lejarazu**

## 1. INTRODUCCIÓN

En el año 2006 se cumplen los 25 años de la primera descripción de lo que posteriormente constituiría el llamado Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Pocos meses después de la descripción de este síndrome se descubría el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y se abría la puerta para el diagnóstico microbiológico de la enfermedad. Durante estos años la epidemia no ha dejado de crecer y nuestro país no ha sido ajeno a este hecho. En la actualidad se calcula que en España existen alrededor de 150.000 personas infectadas por el VIH. Afortunadamente el número de nuevas infecciones ha bajado, pero la generalización de los tratamientos antirretrovirales de gran eficacia ha condicionado que aunque exista una tendencia al estancamiento de la enfermedad, la atención asistencial que precisan ha aumentado al tener una mayor expectativa de vida.

Los laboratorios de microbiología han tenido que hacer un gran esfuerzo para adaptarse a las demandas clínicas que requieren estos enfermos. Si durante los años 80 y 90 se tuvieron que desarrollar e implantar nuevas técnicas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones oportunistas, durante el final de los años 90 y el comienzo de esta década se ha generalizado el uso de las determinaciones de la carga vírica plasmática y de la detección y análisis de las mutaciones que confieren resistencias a los fármacos antirretrovirales.

El presente procedimiento constituye la segunda 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. Su objetivo ha sido orientar de forma conceptual y práctica la metodología empleada en el diagnóstico y seguimiento de la infección por el VIH. A efectos prácticos se ha dividido en 3 apartados claramente diferenciados.

En primer lugar se analiza y actualiza el diagnóstico serológico, que aunque es el terreno en el que, quizás, se han producido menores cambios, sí que hay novedades y actualizaciones que merece la pena ser resaltadas respecto a la anterior edición. El cribado de anticuerpos continúa siendo el método más comúnmente empleado para el diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH. A pesar de los avances logrados en el desarrollo de estas pruebas se siguen produciendo casos de falsos positivos y falsos negativos, atribuibles al enorme crecimiento de esta demanda analítica dentro de la asistencia clínica. La importancia de estos hechos es obvia, pudiendo provocar situaciones que generan ansiedad en los pacientes y desconcierto en los profesionales encargados de dicho diagnóstico.

En una segunda parte se describe la determinación de la carga vírica plasmática (CVP), técnica que ha experimentado un enorme desarrollo. En la infección por el VIH, más que en ningún otro proceso infeccioso, la cuantificación y monitorización del agente tiene un extraordinario valor informativo.

La determinación de la CVP mediante la cuantificación del ARN vírico por métodos de biología molecular es una herramienta clave en el manejo de pacientes infectados fundamentalmente por su valor pronóstico y evolutivo. Dicho valor quedó claramente establecido al confirmar su consistencia como parámetro independiente de desarrollo de SIDA y respuesta a tratamiento. Las técnicas para su cuantificación mediante RT-PCR y bADN están actualmente disponibles desde el punto de vista comercial y pueden llegar a alcanzar un nivel de sensibilidad de al menos 50 copias por mililitro.

Finalmente, un tercer apartado que se introduce por primera vez en el Procedimiento es el estudio de las resistencias a los fármacos antirretrovirales. Ya desde el mismo momento de la introducción de la zidovudina en monoterapia se observó que el virus era capaz de hacerse resistente a dicho fármaco a través del desarrollo de mutaciones en el gen de la transcriptasa inversa. En la actualidad la resistencia a los fármacos antirretrovirales constituye una de los principales problemas en el manejo clínico diario, calculándose que alrededor del 40% de los pacientes tienen algún tipo de resistencia a los 6 años del inicio de la terapia antirretrovírica (TAR). La gran importancia que esta adquiriendo la detección y el estudio de las resistencias a estos fármacos justifican su inclusión en este procedimiento y probablemente se convierta en los próximos años en una de las piedras angulares del diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH.

## 2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

### 2.1. CONDICIONES DEL LABORATORIO Y PRECAUCIONES CON LAS MUESTRAS

Los laboratorios que realicen diagnóstico de anticuerpos frente al VIH en suero deben observar las normas de seguridad de nivel 2. Todas las muestras deberán considerarse como potencialmente infecciosas para evitar el manejo de algunos sueros con precauciones distintas o menores. Esto implica la necesidad de trabajar con guantes en todos los procesos, pipeteado mecánico, utilización de contenedores de seguridad biológica para desecho de fómites, muestras y reactivos así como observación de normas y precauciones consideradas como *bona praxis*. Las superficies de trabajo deberán descontaminarse con desinfectantes (alcohol-acetona al 70% v/v, lejía, detergentes, incluido el jabón, etc.) activos contra el VIH.

Los sueros se deben recoger en la forma habitual y evitar mantenerlos más de 24 horas a temperatura ambiente. Para minimizar las contaminaciones microbianas se recomienda usar tubos estériles y no conservarlos a +4°C más de 72 horas. Para periodos de conservación más prolongados se deben utilizar temperaturas de -20° y -70°C, sobre todo si se prevé la necesidad de detectar antígeno p24 u otros componentes estructurales del VIH, ya que estos últimos se desnaturalizan paulatinamente a temperaturas superiores a -70°C. Los sueros no debieran inactivarse por calor por las razones expuestas.

Existen centros que realizan la extracción de sangre en el mismo laboratorio por personal entrenado para ello, en otros se confía dicha tarea a puntos de extracción comunes para todos los laboratorios del hospital y, en casi todos, se reciben muestras de suero que se han obtenido sin que el laboratorio que realiza las pruebas diagnósticas del VIH tenga posibilidad de supervisar los métodos y pautas de extracción, conservación o el tratamiento previo de los sueros. A este respecto cabe señalar la importancia de una correcta y cuidadosa identificación de los pacientes y su correspondiente suero cuando el objetivo sea el diagnóstico del VIH. La relación de confianza entre los pacientes y el personal sanitario hace que, en ocasiones no se verifique de forma fehaciente la identidad de la persona que acude a realizarse el análisis. Este proceder cuando se refiere a pruebas de diagnóstico del VIH, basadas en el consentimiento informado por parte del paciente, tiene gran trascendencia para evitar lo que denominamos errores en la extracción e identificación de sueros y pacientes. Los laboratorios que reciben y almacenan gran número de sueros para realizar determinaciones de anticuerpos anti-VIH deben asegurar un sistema de registro que evite coincidencias y confusiones.

Todas estas condiciones y precauciones observadas de forma sistemática, constituyen el primer peldaño para la ejecución correcta de las pruebas para el diagnóstico de la infección por el VIH.

## 2.2. OBJETIVOS DE LAS PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE AL VIH

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió hace años, de manera clara y sucinta cuales son los objetivos de las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH. La mayoría de casos o situaciones en la práctica diaria del laboratorio pueden ser incluidos en uno de los siguientes apartados: seguridad biológica (cribado de donantes de sangre, órganos, semen, óvulos,...), diagnóstico de la infección por el VIH, vigilancia epidemiológica e investigación.

Los objetivos que se persiguen con el diagnóstico influyen en la elección de la técnica apropiada, en la actitud del profesional de laboratorio ante un resultado y en la estrategia o algoritmo de confirmación. De forma conceptual **se denominan pruebas diagnósticas a las que se emplean de forma individualizada en el suero de una persona bajo los principios clínicos de consentimiento informado y sirven para la identificación clínica de un paciente como infectado o no infectado por el VIH**. Cuando las pruebas se aplican en virtud de criterios de seguridad biológica, vigilancia epidemiológica o investigación y el objetivo principal no es el diagnóstico clínico de infección por el VIH, las denominamos pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH en sentido estricto y en estos casos se pueden emplear con éxito muestras alternativas al suero. Como veremos más adelante, esta distinción, aparentemente semántica,

condiciona la utilización de las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH de forma coordinada y secuencial.

En todo caso, las pruebas habituales de detección de anticuerpos frente al VIH constituyen un primer escalón en el diagnóstico de la infección por este virus y se aplican en la práctica clínica a un gran número de sueros. Así la sencillez y la posibilidad de automatización son cualidades que deben tenerse en cuenta a la hora de elegir una prueba en particular.

## 2.3.- CARACTERÍSTICAS OPERACIONALES DE LAS PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE AL VIH

La sensibilidad y la especificidad son los parámetros más importantes para valorar una prueba y, en el caso de la aplicación clínica de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de la infección por el VIH son muy importantes el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN).

La sensibilidad de los equipos actuales ha alcanzado límites máximos; es frecuente leer artículos en los que se mencionan sensibilidades de un 99-100% para el conjunto de muestras ensayadas. Conviene señalar sin embargo las dificultades de alcanzar una sensibilidad real del 100% en una infección en la que la seroconversión ocurre en un lapso de tiempo de 2 a 4 semanas en la mayoría de los casos y, a veces, hasta varios meses ("período ventana"). Cabe recordar a este respecto la posibilidad de encontrar individuos infectados por el VIH que son seronegativos debido a causas orgánicas o a defectos inmunes (falsos negativos).

Es bien conocido que el incremento de la sensibilidad lleva aparejado un descenso de la especificidad (falsos positivos); aunque las técnicas actuales ofrecen cifras de especificidad en torno al 99%, el aumento espectacular que ha experimentado la demanda analítica de pruebas de diagnóstico de la infección por el VIH hace que los hallazgos de falsos positivos de anticuerpos frente al VIH sean cada vez más frecuentes, a pesar de las mejoras técnicas introducidas en las pruebas primarias de detección de anticuerpos frente al VIH.

Por otra parte la prevalencia de la infección por el VIH entre la población estudiada condiciona los valores predictivos. A menor prevalencia, el VPP disminuye o, dicho de otra manera, mayor es la probabilidad de que se produzcan resultados falsos positivos en una población con bajas tasas de infección por el VIH. En muchos centros en los que se realizan las pruebas de detección del VIH el porcentaje de sueros positivos ha descendido en los últimos años hasta 10 veces respecto a los encontrados hace 15 ó 20 años cuando se inició el diagnóstico de este virus. Las causas de este fenómeno son variadas y cabría citar entre ellas: el aumento de la sensibilidad hacia la infección por el VIH por parte de los sanitarios, la existencia de protocolos específicos de cribado serológico en los enfermos renales, hemodializados, exposición accidental, control de las mujeres gestantes e, incluso, en las pruebas analíticas preoperatorias,

estrategia esta última de cuestionable utilidad. Todas estas situaciones clínicas han propiciado un aumento sustancial de la demanda analítica de pruebas para diagnosticar la infección por el VIH y un descenso en la tasa de positividad total, por lo que el riesgo de tener resultados falsos positivos en el escalón primario del diagnóstico es más elevado que antes. Por ello cualquier laboratorio que ponga en marcha este tipo de técnicas deberá contar entre sus procedimientos de laboratorio con una estrategia o estrategias de confirmación.

#### 2.4.- PRUEBAS DE CRIBADO DE ANTICUERPOS FRENTE AL VIH

Las pruebas de detección habituales de anticuerpos frente al VIH han experimentado un

considerable desarrollo y mejoras desde su aparición inicial. Básicamente las mejoras han afectado, principalmente, al antígeno o antígenos utilizados en el ensayo y al principio técnico en el que se fundamentan dichas reacciones.

La mayoría de las primeras técnicas utilizaron antígenos víricos crudos más o menos purificados denominados "lisados víricos". Estos antígenos contenían gran cantidad de proteínas procedentes del sistema celular en el que se había cultivado el virus. La posibilidad de una reacción inespecífica del suero con algunos de estos componentes constituyó un problema que hizo obligado el empleo de pruebas de confirmación. En la Tabla 1 aparece la evolución de los antígenos que se han ido incorporando a los equipos de detección de anticuerpos frente al VIH.

**Tabla 1.** Antígenos empleados en las pruebas de detección primaria de anticuerpos frente al VIH

Técnica	Antígeno
EIA 1ª generación	Lisado vírico VIH-1
EIA 2ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2
EIA/ELFA 3ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2 y antígeno VIH-1 del grupo "O" ( <i>outlayer</i> o marginal)
EIA/ELFA 4ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2 y VIH-1 "O" y anticuerpos para detectar el antígeno p24

EIA: enzimoimmunoanálisis; ELFA: *enzyme-linked fluorescent assay*

La evolución de los antígenos incluidos en las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH ha permitido por una parte incrementar la sensibilidad sin merma de la especificidad y por otra ha hecho posible la detección de anticuerpos frente tipos y subtipos del VIH que escapaban a los equipos de diagnóstico habituales. A pesar de las mejoras introducidas en los equipos actuales, debe tenerse en cuenta la posibilidad real de encontrar sueros de pacientes infectados por subtipos inusuales del VIH, sobre todo en pacientes africanos o en personas con estancias prolongadas en ese continente.

Respecto al principio técnico que emplean, cabe mencionar que la gran mayoría están basados en el enzimoimmunoanálisis (EIA): indirecto, en *sandwich* y de captura. Existen EIA competitivos que tienen una gran especificidad aunque adolecen de cierta falta de sensibilidad en algunos momentos de la infección por el VIH, como al inicio de la seroconversión y en los pacientes en estadios terminales. Sin embargo, combinadas con otras pruebas de mayor sensibilidad en forma secuencial, pueden proporcionar excelentes resultados en la estrategia diagnóstica. Estos tipos de pruebas han sufrido también variaciones tecnológicas, siendo una de ellas la utilización de sustratos fluorescentes que han dado lugar a las pruebas denominadas ELFA (*enzyme-linked fluorescent assay*). La última aportación a las pruebas inmunoenzimáticas ha sido la detección simultánea de antígeno p24 y anticuerpos frente al VIH, lo que acorta el *período ventana*. Diversos trabajos publicados y experiencias realizadas en nuestro laboratorio ponen de manifiesto un adelanto

entre una a dos semanas en la detección serológica de la infección por el VIH, aspecto a considerar si tenemos en cuenta que en el período ventana la infectividad de un individuo es más elevada.

Existen pruebas basadas en la técnica de aglutinación pasiva que ofrecen ventajas por su sencillez y simplicidad de ejecución así como por la posibilidad de realizar titulaciones de forma sencilla. La dificultad de automatización las hace poco adecuadas para procesar gran número de sueros y están menos extendidas. Estas técnicas están diseñadas para detectar tanto anticuerpos de la clase IgG como IgM y en la actualidad son poco utilizadas.

Entre las pruebas de cribado de anticuerpos VIH, las denominadas **pruebas rápidas** han experimentado un desarrollo importante; los antígenos que emplean son similares a los EIA y ELFA y el tiempo en el que se puede obtener un resultado oscila entre 5 y 20 minutos. Aunque las características operacionales son inferiores a los EIA y ELFA deben tenerse en cuenta para situaciones de urgencia. Combinadas con otras pruebas de detección de anticuerpos constituyen una estrategia que mejora la especificidad de los resultados de forma asequible en términos de costes laborales y de tiempo. En la Tabla 2 se exponen algunas de las más utilizadas; son preferibles aquellas que permiten detectar anticuerpos frente al VIH-1 y VIH-2 de forma separada. Su mayor inconveniente reside en la lectura que siempre es subjetiva y con algunos sueros pueden producirse reactividades que generen dudas de interpretación.

**Tabla 2.** Pruebas rápidas para la detección de anticuerpos frente al VIH

Técnica	Antígeno
Dot-EIA 1ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2 en un único "spot".
Dot-EIA 2ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1, VIH-2 y VIH-1"O" en "spots" diferenciados para VIH-1 y VIH-2
Látex/Aglutinación pasiva	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1, VIH-2 y VIH-1"O".
Inmunocromatografía capilar	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1, VIH-2 y VIH-1"O".

En los últimos años, han aparecido pruebas rápidas basadas en el principio de la inmunocromatografía capilar que han mejorado de forma importante la sensibilidad y la especificidad de éstas respecto a las de Dot-EIA. Se deben elegir aquellas que tengan controles internos que verifiquen el correcto funcionamiento de la reacción.

### 2.5.- PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE AL VIH

La trascendencia de la infección por el VIH hace necesaria la confirmación de los resultados positivos obtenidos en las pruebas de detección primaria de anticuerpos; este paso es **inexcusable cuando el objetivo de las pruebas sea el diagnóstico** y puede ser obviado cuando aquellas se realicen para seguridad biológica. Sin embargo en el ámbito hospitalario es cada vez más frecuente que se confirmen todos los resultados positivos de sueros u otras muestras, incluidas aquellas en las que el objetivo principal no es el diagnóstico. Existen

diferentes pruebas de confirmación; entre ellas cabe citar las basadas en los principios de inmunoelectrotransferencia o *western blot* (WB), de inmunofluorescencia indirecta (IFI), de radioinmunoprecipitación (RIPA) y de inmunoblot con antígenos recombinantes (LIA).

La técnica más ampliamente utilizada para confirmación es el WB. Las técnicas de IFI y RIPA por razones distintas (subjetividad de la lectura, requerimientos de laboratorio, etc.) se emplean cada vez menos, de tal forma que los resultados de confirmación por WB son considerados el estándar o patrón para confirmar la presencia de anticuerpos frente al VIH. Existen distintos criterios de positividad emitidos o recomendados por organismos o sociedades involucrados en el diagnóstico de la infección por el VIH (Tabla 3), de ellos el de la OMS es el más específico cuando se manejan sueros de procedencia poblacional muy diversa.

**Tabla 3.** Criterios de positividad en WB para confirmación de infección por el VIH-1.

CRITERIO	REACTIVIDAD FRENTE A
Organización Mundial de la Salud	Dos glicoproteínas cualquiera de: gp160, gp120, gp41
Cruz Roja Americana	Una proteína de cada gen estructural ( <i>env</i> , <i>pol</i> y <i>gag</i> )
Food and Drug Administration	p24 + p32 + (gp41 o gp120 o gp160)
CRSS*	p24 + (gp41 o gp120 o gp160) o p32 + (gp41 o gp120 o gp160)
CDC/ASTPHLD**	p24 + (gp41 o gp120 o gp160) o gp41 + (gp120 o gp160)

\*Consortium for Retrovirus Serology and Standardization. \*\*Centers for Disease Control/Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors

El WB contiene los antígenos del propio VIH, algunas de sus proteínas precursoras y antígenos de origen celular. Existen modalidades que incorporan en un extremo diferenciado de la tira un péptido sintético específico del VIH-2 (gp36), que facilita la sospecha de infección por VIH-2 en coinfecciones y en WB indeterminados para el VIH-1. Debido a que las tiras de nitrocelulosa en las que se depositan los

antígenos del VIH contienen, en mayor o menor cantidad, proteínas de la célula huésped en la que se ha cultivado el virus, a menudo se observan bandas de reactividad contra dichas proteínas, de ahí la necesidad de adiestramiento en la lectura e interpretación de las bandas de origen vírico. Es conveniente adoptar una disciplina metodológica en la lectura e interpretación de bandas de reactividad

del WB (Tabla 4); que deberá ser uniforme y sistematizada para cada laboratorio. Los sueros se consideran positivos cuando cumplen el criterio de positividad adoptado por el laboratorio,

negativos cuando no se observa ninguna banda de reactividad, e indeterminados cuando se observan reactividades distintas a las del criterio de positividad.

**Tabla 4.** Pautas de lectura del Western Blot

- 
- 1º-Identificación de bandas específicas víricas de reactividad.
  - 2º-Valoración de la reactividad de cada banda (0, 1, 2, etc.)
  - 3º-Anotación individualizada de resultados en cada muestra.
  - 4º-Aplicación del criterio de positividad.
  - 5º-Emisión de resultados e informe.
- 

Los resultados indeterminados de la prueba WB son la mayor fuente de ansiedad en pacientes y los que pueden llegar a generar desconcierto en los responsables del diagnóstico. Las causas de reactividades anormales en WB son muy variadas y no están totalmente explicadas. Se han descrito resultados indeterminados en personas con factor reumatoide en el suero, lupus eritematoso, hiperbilirrubinemias, infección por otros retrovirus, parasitosis y por otras causas. En la membrana de envoltura del VIH pueden estar presentes antígenos HLA que produzcan reactividades en el WB hasta en

el 30% de los individuos multitransfundidos que originen falsas reactividades.

En la Tabla 5 se reflejan algunas de las reactividades más frecuentemente observadas en las pruebas de confirmación mediante WB. La conducta a seguir en estos casos, tenderá a **limitar y minimizar la ansiedad en el paciente** sin descartar la posibilidad de una seroconversión u otra infección por retrovirus (HTLV-I y HTLV-II), alertando al clínico sobre dicha eventualidad.

**Tabla 5.** Reactividades frecuentes en resultados indeterminados de Western Blot

Bandas de reactividad observadas	Posible causa y seguimiento
Una glicoproteína aislada (gp160, gp120 o gp41)	Inicio de la seroconversión, infección por otros tipos de VIH, frecuente en la serorreversión pediátrica (hijos de madres infectadas) Repetir WB en otro suero 7 días más tarde en adultos. En niños PCR y seguimiento.
P24 aislada	Descartar VIH-2 u otros tipos VIH según procedencia geográfica Frecuente en resultados indeterminados de embarazadas, multitransfundidos y pacientes africanos. Descartar VIH-2 u otros tipos de VIH. Otros retrovirus (HTLV-I/II) Puede persistir años en pacientes VIH-seronegativos
P17 aislada	Causa desconocida No es necesario el seguimiento
Otras bandas del core aisladas	Inespecificidades muy variadas (ver tabla 8) Anamnesis para posibles factores de riesgo o de WB indeterminado Seguimiento a los 7-15 días si hay factores de riesgo
Más de una banda del core o bandas no víricas	Frecuente en multitransfundidos, enfermedades autoinmunes, etc. Anamnesis para posibles factores de riesgo. Seguimiento hasta 3-6 meses para ver evolución.

Para minimizar los problemas debidos a resultados indeterminados observados en el WB se han desarrollado técnicas de *immunoblot* con péptidos recombinantes o pruebas de LIA. Estas tienen una lectura más estructurada, que se puede hacer por densitometría en algunos casos, obviando los problemas de subjetividad en la apreciación de la intensidad de las bandas. En nuestra opinión pueden ser empleados por laboratorios que precisen confirmar un gran número de muestras (automatización) y en los que importe menos el conocimiento de las causas de falsa positividad obtenidas en las pruebas de cribado de anticuerpos.

Por lo general estas pautas se utilizan para confirmar sueros positivos pero, en determinados casos, pueden usarse para confirmar sueros negativos, debido al amplio contenido de antígenos del VIH respecto a las pruebas de detección primaria de anticuerpos. Los informes clínicos de los resultados de estas pruebas deben expresar de forma clara si la persona es positiva o negativa para anticuerpos frente al VIH o si se aconseja seguimiento o pruebas adicionales; cualquier cambio que haga el laboratorio respecto a los criterios de positividad adoptados deberá comunicarse a los clínicos que atienden a los pacientes infectados por el VIH.

## 2.6. ESTRATEGIAS DE CRIBADO Y CONFIRMACIÓN

La OMS hizo unas recomendaciones hace años que pueden servir de base para establecer la estrategia de confirmación, siempre teniendo en cuenta el objetivo para el que se realiza la prueba de detección de anticuerpos frente al VIH y la prevalencia de éstos observada o estimada en una población dada (Tabla 6).

La estrategia I de seguridad biológica, que constituye el proceder actual en la mayor parte de centros de hemoderivados, se basa además de las técnicas de cribado de anticuerpos frente al VIH en la detección por PCR del VIH en lotes de sueros. De esta forma se acorta el periodo ventana que precede a la aparición de anticuerpos y se confiere mayor seguridad a las donaciones. La estrategia II se basa en la realización de dos pruebas que emplean un principio técnico diferente y sólo sería de aplicación para estudios de serovigilancia cuando la prevalencia sospechada de infección por el VIH fuera inferior al 10%.

Finalmente la estrategia III es la más recomendable en el entorno español con alta demanda de solicitudes y una baja prevalencia (<10%) de diagnósticos positivos. En esta estrategia, las muestras reactivas por dos técnicas de cribado son analizadas por una tercera prueba de confirmación (W. Blot, LIPA,...). En este sentido cabría fácilmente implementarse en el laboratorio un algoritmo que combinara una prueba de EIA para detectar anticuerpos frente al VIH de 3ª, o mejor de 4ª generación y otra de las denominadas rápidas, preferiblemente basada en el principio técnico de inmunocromatografía capilar (ICC). De esta forma las muestras inicialmente reactivas por un EIA o ELFA de 3ª o 4ª generación se pueden informar y solicitar

una nueva muestra para prueba de confirmación basada preferentemente en el principio del inmunoblot (Western Blot o similares).

Cuando el objetivo de la prueba de detección de anticuerpos frente al VIH es el diagnóstico y la prevalencia de positivos es <10% se recomienda el uso de tres técnicas con un principio o antígeno distinto y parece obligado que figure entre aquéllas el WB u otra técnica que identifique de forma individualizada las distintas reactividades de los antígenos del VIH. Para diagnosticar a una persona como positiva e infectada por el VIH las tres pruebas deben ser positivas. Es probable que en muchos laboratorios sólo se disponga de una prueba de detección de anticuerpos (EIA o ELFA) y una segunda de confirmación (WB, LIA o IFI) en este caso pueden producirse por las razones mencionadas previamente, situaciones problemáticas respecto al diagnóstico de la infección por el VIH sobre todo en individuos asintomáticos. Por ello es altamente recomendable que en el laboratorio o en el hospital al menos, se disponga de dos pruebas primarias de detección de anticuerpos frente al VIH de distinto fabricante o que empleen un principio técnico distinto. Esta precaución permite fácilmente cumplir con la recomendación mencionada en la estrategia III y aumenta nuestra fiabilidad diagnóstica. Además de poner antes de manifiesto la existencia de posibles discrepancias, la adopción de esta medida permite no tener que depender del mismo proveedor, lo cual soslaya los fallos temporales con lotes concretos de reactivos. En todo caso, la técnica utilizada en primer lugar, en cualquiera de las estrategias debe ser la que posea la máxima sensibilidad y las siguientes deben ser las de mayor especificidad.

**Tabla 6.** Estrategias de determinación de la presencia de anticuerpos frente al VIH

OBJETIVO	PREVALENCIA	ESTRATEGIA	
Seguridad biológica	Cualquiera	I	
Diagnóstico	Paciente sintomático	II	
	Asintomático	≥ 10%	II
		< 10%	III
Serovigilancia	≥ 10%	I	
	< 10%	II	

## 2.7. PROBLEMAS EN EL CRIBADO Y CONFIRMACIÓN. ALGORITMO DE DECISIÓN.

Los problemas que se presentan en el cribado y confirmación de la detección de anticuerpos frente al VIH 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 ocurren cambios en la dinámica de producción de anticuerpos desde el momento de la seroconversión. El periodo *ventana* de dos a cuatro semanas de duración se caracteriza por la ausencia de anticuerpos y la presencia de antígeno p24,

proteína mayoritaria del core del VIH y ARN vírico. En estadios finales de la infección desaparecen los anticuerpos frente a algunas de las proteínas estructurales internas del virus (p24, p17, p55, etc.) y en algunos individuos se ha comunicado la ausencia de criterios diagnósticos de positividad por WB en los meses finales de la enfermedad, como consecuencia del intenso deterioro inmunitario.

En el laboratorio de virología tienden a preocupar más los resultados falsos positivos, tanto en las pruebas de cribado como en las de confirmación (menos frecuente), sobre todo cuando éstos se producen en personas sin ningún factor de riesgo como ocurre generalmente. Las causas de falsos positivos son variadas (Tabla 7) y dependen básicamente de dos elementos, la técnica (antígenos y principio técnico empleado) y las condiciones derivadas del paciente. La evolución de las técnicas y antígenos utilizados ha reducido la aparición de falsos positivos que en las primeras pruebas podía llegar en algunas situaciones particulares hasta el

5% y que en la actualidad es inferior al 1%. A pesar de ello hay causas de falsos positivos relativas a la extracción, conservación y procesamiento del suero que pueden minimizarse con las precauciones comentadas al principio de este procedimiento.

Entre las causas debidas a condiciones del paciente se indican repetidamente en la literatura las reactividades por autoanticuerpos; a este respecto cabe señalar la presencia en la envoltura del VIH de antígenos del sistema HLA procedentes de la célula huésped que explican en parte las falsas reactividades observadas en sueros de individuos trasplantados, multitransfundidos y otros con enfermedades autoinmunes. Por último existen otras condiciones que se han señalado como causa de falsas positividades listadas en la Tabla 7; la peculiaridad y complejidad de las mismas ilustran sobre la necesidad de realizar una anamnesis para identificar la existencia de esas condiciones ante un caso de falsa positividad en la determinación de anticuerpos frente al VIH.

**Tabla 7.** Causas de falsos positivos en pruebas séricas de detección de anticuerpos frente al VIH

Relativas al suero	Relativas a autoanticuerpos	Relativas a otras condiciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Congelación y descongelación repetida</li> <li>• Almacenamiento a temperatura subóptima</li> <li>• Aspecto lipídico o turbio del suero</li> <li>• Contaminación microbiana</li> <li>• Sueros tratados con calor (<math>\geq 60</math> °C)</li> <li>• Errores de extracción o identificación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Personas con anticuerpos anti-HLA-DR4, DQw3</li> <li>• Enfermedades reumatoideas Polimiositis</li> <li>• Lupus eritematoso</li> <li>• Multitransfundidos</li> <li>• Trasplantados renales</li> <li>• Multíparas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemodializados, fracaso renal crónico</li> <li>• Síndrome de Stevens-Johnson</li> <li>• Administración previa de inmunoglobulinas</li> <li>• Sueros postvacunales (gripe, hepatitis B)</li> <li>• Infecciones agudas por virus ADN</li> <li>• Enfermedad hepática alcohólica grave</li> <li>• Cirrosis primaria biliar, colangitis esclerosante</li> <li>• Pacientes con parasitosis (sanguíneas o tisulares)</li> <li>• Pacientes con discrasias sanguíneas congénitas</li> <li>• Usuarios de drogas por vía parenteral</li> </ul>

Los criterios de confirmación están basados en la experiencia y conocimientos de los expertos pero no son infalibles. El laboratorio deberá evaluar el criterio de positividad empleado para el WB (si es la técnica que se utiliza para confirmar) ya que algunos de los criterios recogidos en la Tabla 3 son menos restrictivos que otros y pueden propiciar falsas confirmaciones. En nuestra experiencia el criterio propuesto por la OMS es el que se adapta mejor a la realidad hospitalaria y las pruebas LIA que utilizan dicho criterio son las que dan menos errores en la confirmación.

Finalmente es necesario alertar sobre la posibilidad de falsos negativos en el diagnóstico y en la determinación de anticuerpos frente al VIH, circunstancia que probablemente se percibe con menos frecuencia debido al principio, generalmente admitido, por el que **los resultados negativos no son reconfirmados si no existe una indicación clínica precisa al respecto**. Las causas de falsa

negatividad son también variadas (Tabla 8). Los falsos negativos pueden constituir sólo una rareza o excepción entre los infectados por el VIH, pudiendo existir pacientes infectados por el VIH pero seronegativos, debido a causas orgánicas derivadas de una respuesta aberrante o anormal a la infección por el VIH. En el pasado se han producido falsos negativos causados por fallos de los equipos de detección de anticuerpos frente al VIH o incapacidad de detección y confirmación en individuos infectados por algunos tipos o subtipos marginales del VIH (distintos del B).

**Tabla 8.** Causas de falsos negativos en pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH

- 
- Periodo *ventana* que precede a la aparición de anticuerpos
  - Infección por tipos de VIH no detectables por los antígenos incluidos en la prueba
  - Terapia inmunosupresora prolongada
  - Trasplante de médula ósea
  - Disfunciones de linfocitos B
  - Plasmaféresis, exanguinotrasfusión
  - Neoplasias
  - Errores de extracción o identificación
  - Fallos en el principio técnico o proceso de fabricación del equipo diagnóstico
  - Respuestas anómalas ante la infección por el VIH
- 

Algunas de estas situaciones provocan la alarma cuando el objetivo perseguido en la determinación de anticuerpos frente al VIH es la seguridad biológica (bancos de sangre, hemoderivados, donaciones). Por ello la adopción de técnicas de EIA/ELFA de cuarta generación debe utilizarse para minimizar al máximo el periodo *ventana*; por otra parte, aunque el valor predictivo negativo sea elevado, se debe insistir en descartar el diagnóstico de infección por el VIH mediante pruebas complementarias cuando la anamnesis revele factores de riesgo, síntomas u otros datos de laboratorio o indicaciones clínicas sugestivas de infección por el VIH. El algoritmo de decisiones propuesto para la serología VIH (Figura 1) pretende tener en cuenta las diferentes situaciones y contexto clínico en los que se produce generalmente la demanda de una prueba de detección de anticuerpos frente al VIH y las consecuencias que los resultados y el informe de la misma deben tener en la manera de proceder.

El cribado de anticuerpos frente al VIH desborda en el momento actual por su transcendencia la mera oferta diagnóstica. Las aplicaciones hospitalarias de esta prueba han hecho que en la mayoría de los hospitales las peticiones de esta analítica hayan crecido de forma exponencial en los últimos años. Como consecuencia del aumento de peticiones y del descenso consiguiente de los porcentajes de positividad se producen resultados falsos positivos en situaciones de difícil manejo clínico (candidatos a trasplantes, pacientes hemodializados, mujeres embarazadas) que obligan a una diversificación de las estrategias diagnósticas y de los métodos de cribado. En este contexto es aconsejable disponer al menos de dos técnicas de cribado de anticuerpos frente al VIH que empleen un principio técnico distinto de detección (por ejemplo un EIA o ELFA y una prueba rápida de inmunocromatografía) y utilizar cuando ello sea posible un método de confirmación con muestras del mismo paciente tomadas en momentos diferentes.

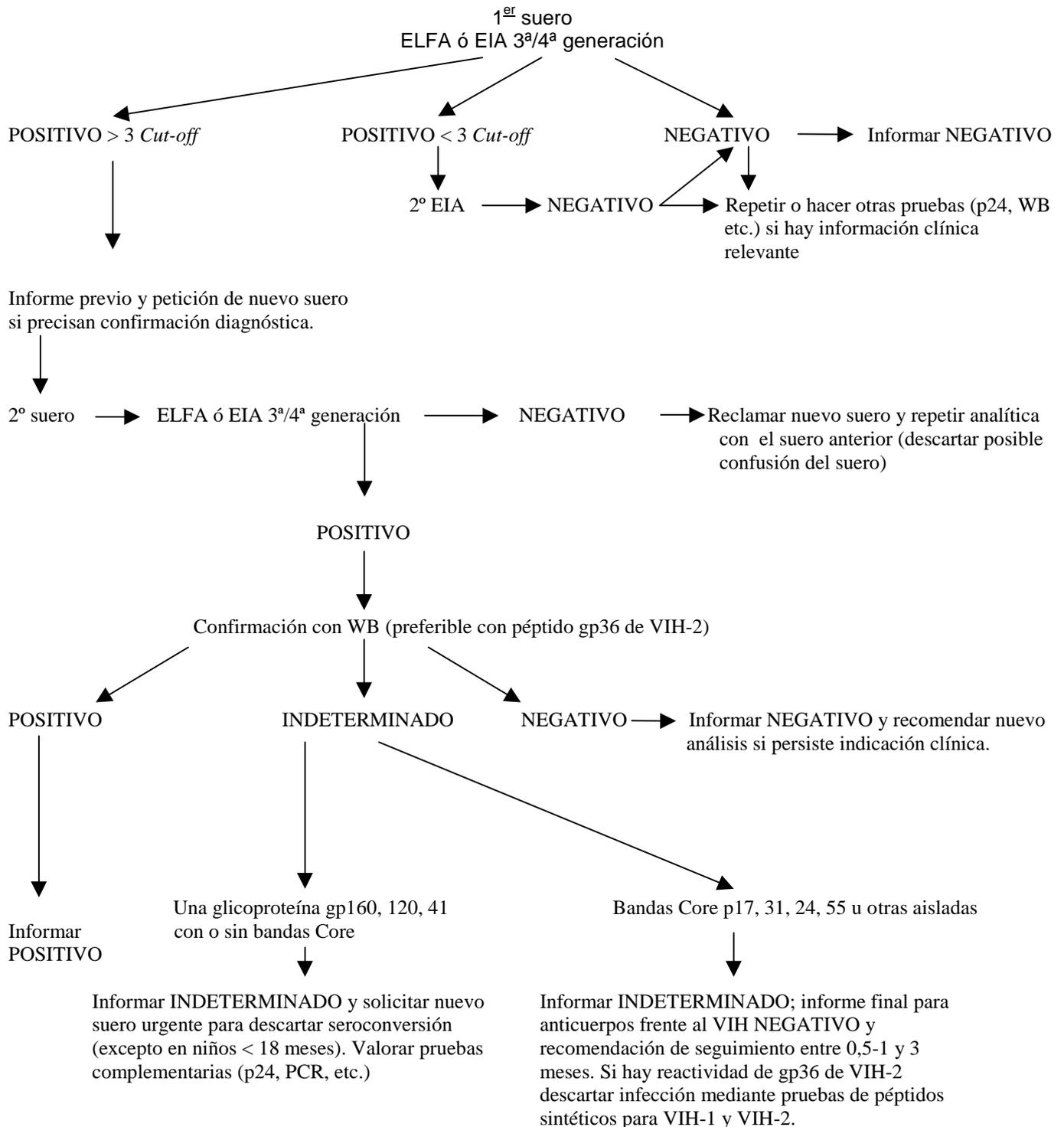
La colaboración entre laboratorios de un mismo hospital que realicen pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH con distintos objetivos (por ejemplo, Virología y Hematología) o de una misma área sanitaria puede minimizar el coste y facilitar la implantación de estas recomendaciones, coordinando

las técnicas que cada laboratorio asume y organizándose en protocolos de actuación concretos.

En el momento actual pueden producirse situaciones clínicas que den lugar a la necesidad de seguimiento serológico del paciente al menos durante dos o tres semanas y a la utilización de otros marcadores serológicos de infección por el VIH (antígeno p24, detección de ARN vírico). A pesar de la sensibilidad de estas pruebas, el diagnóstico definitivo deberá confirmarse con el suero cuando tenga lugar la seroconversión; por eso es altamente recomendable la adopción de pruebas EIA/ELFA para detección simultánea de anticuerpos y antígeno p24 del VIH cuando se trabaje en situaciones clínicas que prevean un alto riesgo de detectar seroconversiones (clínicas de desintoxicación, centros de metadona, etc.) o en aquellos casos en los que exista riesgo de donar un órgano de un paciente en el período de seroconversión.

Finalmente, cuando el objetivo de las pruebas sea el diagnóstico, se debe tener en cuenta que los pacientes rara vez entienden, como lo hacen los profesionales, expresiones tales como: "falso positivo", "indeterminado", "positivo dudoso", etc. y en consecuencia, se debe extremar el cuidado al emitir los informes del laboratorio, estableciendo informes claros. Del conjunto de pruebas realizadas deberá resultar un diagnóstico claro y concluyente o bien la formulación de recomendaciones precisas para el seguimiento y el diagnóstico definitivo.

**Figura 7.** Algoritmo de decisión en serología del VIH



### 3. DETECCIÓN DE LA VIREMIA PLASMÁTICA DEL VIH (CARGA VÍRICA PLASMÁTICA – CVP –)

#### 3.1. TÉCNICAS DISPONIBLES

Todas las técnicas para la determinación de CVP del VIH-1 están aprobadas para su uso en la Unión Europea (marcado CE) y permiten la detección hasta un nivel de 50 copias de VIH por mililitro de plasma utilizando entre 500 µL y 1 mL de plasma (Tabla 9). Las diferencias técnicas fundamentales radican en los formatos, tiempos y capacidad de procesamiento. Las nuevas técnicas de RT-PCR en tiempo real basadas en sondas fluorescentes son en general más rápidas y permiten rangos dinámicos más amplios (40-10<sup>7</sup> copias/mL). La reciente introducción

de la extracción automática de ácidos nucleicos supone un considerable ahorro de trabajo manual y reduce las posibilidades de variabilidad relacionadas con una de las fases más críticas del procedimiento. Todas las técnicas detectan y cuantifican el mayoritario subtipo B y algunos otros subtipos circulantes (A, C, D, F, G) aunque se han comunicado diferencias entre técnicas para algunos de estos subtipos no-B. El procedimiento de Abbott es el que tiene el rango más amplio de detección de subtipos y es el único que cuantifica el grupo O. Ninguna de las técnicas licenciadas detecta el VIH-2.

**Tabla 9.** Técnicas disponibles para la detección de la carga vírica plasmática

Nombre (Compañía)	Técnica		Comentarios
Monitor (Roche)	RT-PCR		Extracción automática disponible Subtipos A-G
Taqman (Roche)	RT-PCR	tiempo real	Extracción automática disponible Subtipos A-G
Abbott Real Time (Abbott)	RT-PCR	tiempo real	Extracción automática disponible Subtipos A-K y grupo O
Versant (Bayer)	bADN		Subtipos A-G
NucliSens (BioMerieux)	NASBA		Extracción automática disponible Subtipos A-G

#### 3.2. INDICACIONES

##### 3.2.1. Monitorización del tratamiento antirretroviral (ARV)

Es el uso más habitual que se le da a la determinación de la CVP. Una vez instaurado el tratamiento antirretroviral la CVP disminuye rápidamente en las primeras semanas y algo más lentamente a partir del primer mes de tratamiento. Se recomienda una determinación basal y al menos una evaluación en las semanas 4, 12 y 24 de tratamiento, para continuar posteriormente el seguimiento cada 3-4 meses. En general se espera una reducción de un log<sub>10</sub> en la primera semana, 2 log<sub>10</sub> en la semana 4 y dependiendo del nivel basal la CVP debería ser indetectable (<50 copias/mL) entre las 16-24 semanas del inicio de tratamiento. Los cambios mayores de 0,3 log<sub>10</sub> entre dos determinaciones (cambios mayores del doble o la mitad) se consideran como significativos.

##### 3.2.2. Predicción de progresión en pacientes crónicamente infectados e inicio del tratamiento.

La recomendación actual para el inicio del tratamiento ARV se establece según la clínica y el nivel de CD4. Se inicia tratamiento en todos los pacientes sintomáticos y en aquellos con CD4 < 200/µL; en pacientes con CD4 entre 200 y 350/µL se recomienda en general iniciar tratamiento aunque en aquellos con cifras más cercanas a 350 y CVP bajas (<20.000 cp/mL) podría diferirse la iniciación, así mismo por encima de 350 CD4/µL podría considerarse el inicio de tratamiento ARV en aquellos pacientes con CD4 más bajos y CVP >100.000 cp/mL por su riesgo de progresión más rápida.

##### 3.2.3. Valoración del riesgo de transmisión

La CVP se correlaciona con riesgo de transmisión del VIH por cualquiera de las vías por las que se transmite el virus. De esta manera, cuanto mayor es la CVP mayor es el riesgo de transmisión. Aunque no puede excluirse completamente, la transmisión del VIH tanto por contacto sexual como por punciones accidentales con agujas, es poco probable por debajo de 1500 cp/mL y esta cifra, junto con las características de la exposición forma parte de los condicionantes que establecen diferentes pautas de profilaxis post-exposición.

##### 3.2.4. Diagnóstico de infección aguda

Durante las primeras semanas de infección los anticuerpos específicos anti-VIH no son detectables por las técnicas diagnósticas rutinarias. Sin embargo la replicación del virus es muy activa en ese momento y alcanza su máximo alrededor de los 10 días post-infección, lo que a menudo coincide con la fase sintomática. Para cubrir este periodo alguna técnica de cribado combina la detección conjunta de anticuerpos y antígeno (p24) específicos. En la actualidad no existe ninguna técnica comercial disponible para detección cualitativa del VIH asociado a células (ADN provírico). Aunque formalmente las técnicas para la determinación de CVP del VIH no tienen un diseño cualitativo (positivo-negativo), dada su sensibilidad se utilizan frecuentemente para cubrir el diagnóstico de una posible infección aguda por el VIH. Si bien la sensibilidad de la técnica para este propósito es excelente, conviene tener en cuenta la eventualidad de resultados falsamente positivos. Generalmente la viremia durante las primeras semanas de la infección

es muy elevada, en general >100.000 cp/mL, por lo que deben interpretarse con muchas reservas los resultados con valores bajos (<10.000 cp/mL).

### 3.3. OBTENCIÓN Y MANEJO DE LAS MUESTRAS

La muestra necesaria para la determinación de la CVP es un tubo de sangre anticoagulada con EDTA o citrato (ACD) de 5-10 mL. No son aceptables los tubos con heparina, que interfiere con algunas técnicas moleculares, ni el suero porque los resultados son menos consistentes. Los tubos con EDTA son los más ampliamente recomendados y aunque el ACD es también aceptable presenta el inconveniente de contener un mayor volumen de sustancia en el tubo de tal forma que puede ser un factor de dilución en tubos solo parcialmente llenos. El plasma se separa por centrifugación a 1000-1500 g (2000-2500 rpm en las centrífugas más 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 parte celular. Este tubo PPT es práctico para transportar el plasma sin manipular la muestra, sin embargo no se debe congelar porque aumenta artefactualmente el número de muestras con viremia de bajo nivel. Es importante considerar la estabilidad de la sangre total y el plasma separado para las determinaciones de CVP del VIH. En general la sangre completa se debe centrifugar y separar el plasma dentro de las primeras 4-6 horas inmediatas a la extracción. En la Tabla 10 se muestra la estabilidad del VIH-1 para la determinación de la CVP según su forma de almacenamiento.

**Tabla 10.-** Estabilidad del VIH-1 para la determinación de la carga vírica plasmática

Sangre completa	6 horas
Plasma separado temperatura ambiente	24 horas
Plasma separado 4° C	6 días
Plasma separado -20°C	Variable (no recomendado para almacenamiento a largo plazo)
Plasma separado -80°C	Meses

### 3.4. CARGA VÍRICA EN LCR, SEMEN Y OTROS FLUIDOS

Aunque la determinación de la CVP del VIH en estas muestras no esta estandarizada, en ocasiones es necesaria su realización en el contexto de estudios de investigación o bajo petición expresa y puntual del clínico responsable.

El LCR se puede procesar por la mayoría de los procedimientos de manera similar al plasma, conviene centrifugarlo en las mismas condiciones que la sangre total para separar células inflamatorias y hematíes. El VIH es un agente con marcado neurotropismo, su presencia en LCR es frecuente y nunca se produce de manera aislada. La concentración de virus en el SNC se correlaciona solo indirectamente con daño neurológico y su determinación raramente tiene interés diagnóstico. Respecto al semen y otros fluidos es posible adaptar las técnicas para la determinación de la CVP tanto en el propio semen como en muestras cervico-vaginales e incluso tejidos. En estos casos es necesario realizar la extracción previa de ácidos nucleicos ya que la viscosidad de las muestras impide el procesamiento automático por algunos de los sistemas. Se trata igualmente de procedimientos experimentales que se realizan en estudios de investigación y la interpretación de los resultados adquiere significado únicamente para el contexto en el que se realiza.

### 3.5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

#### 3.5.1. Resultados y variabilidad

En virología es tradicional utilizar escalas logarítmicas para expresar información cuantitativa

tal como concentraciones de virus o potencia infectiva de inóculos. El rango dinámico en el que se produce la replicación de la mayoría de los virus se traduce en resultados que generalmente comprenden varios órdenes de magnitud por lo que las escalas logarítmicas se utilizan con frecuencia. La mayoría de las técnicas expresan los datos en escala lineal y logarítmica. La variabilidad de las técnicas para la determinación de la CVP es menor de 0,3 log<sub>10</sub>, por tanto cualquier resultado con una diferencia mayor se considera significativo. La mayoría de los pacientes infectados que no reciben tratamiento tienen una CPV detectable en rango muy amplio que puede llegar a más de 10 millones de copias/mL. Por el contrario los pacientes en tratamiento antirretroviral y después de las primeras 16-24 semanas, se espera que tengan una CVP menor de 50 cp/mL. Si la CVP es detectable durante el seguimiento obliga a considerar falta de adherencia al tratamiento o desarrollo de mutaciones de resistencias a los fármacos ARV.

#### 3.5.2. Factores que aumentan la CVP

Aparte 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. Estos episodios se han descrito en infecciones activas (tales como tuberculosis, neumonía por *Pneumocystis jiroveci*, etc.) y tras la administración de vacunas.

#### 3.5.3. Episodios cortos de aumento de la CVP (Blips)

Un 10-15% de pacientes con tratamiento ARV y buen control virológico, que mantienen CVP

indetectable por periodos prolongados de tiempo, presentan ocasionalmente viremia detectable de bajo nivel. Estos episodios conocidos como *blips*, que aparecen en determinaciones aisladas y parecen limitarse sin cambios en el tratamiento, han sido motivo de intenso estudio. Los *blips* no parecen relacionados con falta de cumplimiento ni peor pronóstico a largo plazo. La opinión actual más amplia es que se trata de pequeñas fluctuaciones de la viremia e incluso de errores en el procesamiento de las muestras que resultan en CVP de bajo nivel. Esta consideración está apoyada por el hecho de que muchos de estos *blips* no son reproducibles en laboratorios diferentes. Para que un incremento no esperado de la CVP pueda ser considerado como *blip* debería ser inferior a 500-1.000 cp/mL y en la siguiente determinación debería producirse de nuevo la indetectabilidad.

#### **3.5.4. CVP indetectable en pacientes infectados pero sin tratamiento**

Un porcentaje pequeño (5-7%) de pacientes infectados, 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 ELISA, que está sintomático o tiene las cifras de linfocitos CD4 disminuidas y que no recibe tratamiento antirretroviral, una CVP indetectable debe hacer sospechar una variante no detectada por la técnica generalmente frente al VIH-1 grupo O ó VIH-2; esta situación se debe resolver por técnicas serológicas específicas y por técnicas moleculares.

#### **3.5.5. Viremia detectable por debajo del umbral de 50 copias/mL**

En una proporción importante de pacientes con tratamiento ARV y buen control virológico que mantienen CVP < 50 cp/mL de forma estable, es posible detectar viremia de muy bajo nivel (2-40 cp/mL) utilizando modificaciones de las técnicas convencionales que consisten generalmente en concentrar por centrifugación partículas víricas a partir de mayores volúmenes de plasma (2-10 mL). La evidencia de esta viremia de bajo nivel por debajo del umbral de 50 cp/mL ha sido objeto de intenso debate. Actualmente la mayoría de los estudios sugieren que estas partículas no son producto de replicación de bajo nivel del VIH que no se suprime completamente por las drogas ARV, más bien se tiende a considerar que representan virus liberados por el reservorio celular latente bajo estímulos de activación que no son bien conocidos por el momento y por tanto no suponen, en la mayoría de los casos, una indicación de fracaso terapéutico.

## **4. DETECCIÓN DE RESISTENCIAS**

Las pruebas para la detección de resistencias a antirretrovirales pueden clasificarse en dos tipos: genotípicas o fenotípicas. Las resistencias genotípicas determinan las mutaciones en la secuencia primaria de nucleótidos de la transcriptasa inversa (TI) y de la proteasa (PR) y, recientemente, de la envoltura, comparándola con la secuencia de una cepa salvaje. La resistencia fenotípica se expresa en términos de concentración de droga necesaria 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 vírica *in vitro*. La interpretación de estos valores es diferente dependiendo del fármaco implicado.

### **4.1. TÉCNICAS GENOTÍPICAS**

#### **4.1.1. 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 vírico 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 o de los dideoxynucleótidos. En él se emplea una ADN-polimerasa para sintetizar cadenas complementarias de una de las hebras del ADN problema en cuatro reacciones enzimáticas diferentes. En cada una de ellas junto con el oligonucleótido usado como cebador y la mezcla de los cuatro nucleótidos (dATP + dCTP + dGTP + dTTP) hay una concentración limitante del 2'-3'-dideoxynucleótido (ddNTPs), que al no tener radical hidroxilo en la posición 3' no permite la adición de otro nucleótido parando la extensión de la cadena de ADN. La polimerización a partir del cebador ocurre en sentido 5'-3' hasta que la incorporación de uno de los ddNTPs induce la terminación de la cadena en ese nucleótido. Debe calcularse bien tanto la cantidad de dNTP como la del ddNTP correspondiente para que puedan obtenerse todos los posibles fragmentos que terminan en un nucleótido determinado, que posteriormente se separarán mediante electroforesis. Junto con la aparición de las polimerasas termoestables, se han desarrollado también moléculas químicas que muestran fluorescencia inducida por láser y al unirse a los ddNTPs finalizadores de la reacción permiten la detección del fragmento mediante la emisión de fluorescencia a una cierta longitud de onda. Actualmente se han diseñado cuatro de estas moléculas con emisión de fluorescencia a longitudes de onda diferentes, y así unidas a cada uno de los cuatro ddNTPs, permiten realizar las cuatro reacciones de secuencia en un mismo tubo y pueden cargarse en el mismo pocillo del gel, ya que las bandas de cada nucleótido podrán reconocerse por su color de fluorescencia. Este método se denomina secuenciación unidireccional. Del mismo modo pueden marcarse los cebadores o

primers y hablamos entonces de secuenciación bidireccional.

Los productos de las reacciones de secuenciación se someten a electroforesis (en gel o en capilares) y las bandas que se obtienen (cada una representando uno de los cuatro nucleótidos A, T, G o C) se leen por el secuenciador. 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 (llamada cepa consenso) con el fin de determinar si existen mutaciones. Así se analizan las secuencias de la TI y la PR (recientemente, también gp41) 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)
- Menor cantidad de paradas inespecíficas de la ADN polimerasa por las estructuras secundarias en el ADN molde.
- Análisis de los resultados más rápido y menor tiempo de procesamiento de las muestras.

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 son TRUGENE™ HIV-1 Genotyping Test (Bayer NAD) y ViroSeq™ HIV genotyping system (Abbott Diagnostics). El primero utiliza la secuenciación bidireccional y la electroforesis en gel; el segundo emplea el método unidireccional y la electroforesis capilar. Ambos sistemas ofrecen un software para la edición de las secuencias y un algoritmo propio de interpretación. Se han realizado varios estudios comparativos que no establecen grandes diferencias en cuanto a ambas técnicas.

Además de los protocolos "in house", también existen otros ensayos de secuenciación disponibles. Algunos de ellos (Virco GEN II, Virco; HIV-1 GenotypR PLUS, Specialty Laboratories; GeneSeq, Virologic; GenoSure, LabCorp) sólo están disponibles para su realización en los laboratorios de las casas comerciales que los ofrecen. Otros ensayos comercializados son HIV-1 Mutation Analysis, Focus Technologies; HIV ViroTYPE, Rheumatology Diagnostics Laboratory; y HIV-1 Genotype, Quest Diagnostics.

#### 4.1.2. Otros ensayos genotípicos

Como consecuencia de que sólo una parte minoritaria de los codones que se amplifican por PCR son posiciones de resistencia y que la gran mayoría son polimorfismos, se han diseñado una serie de alternativas a la secuenciación en las que se detectan codones específicos, aunque ninguna de ellas aporta grandes ventajas con respecto a esta. Las que más se han utilizado (1) son: VERSANT® HIV-1 RT Resistance Assay y VERSANT® HIV-1 Protease Resistance Assay (LIPA), que se basan en la hibridación de productos amplificados mediante PCR con sondas específicas distribuidas a lo largo de una tira de nitrocelulosa; el método Affimetrix®, que se basa en la hibridación de productos de RT-PCR utilizando oligonucleótidos inmovilizados sobre una microplaca o *chip*, que permiten la identificación del nucleótido presente en cada posición; la *PCR selectiva*, mediante la cual se detectan mutaciones de resistencia concretas asociadas con determinados codones de la transcriptasa inversa o la proteasa del VIH; y la hibridación diferencial, también denominada "*Point mutation assay*".

#### 4.1.3 Interpretación del genotipo

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 responsables 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 las pruebas genotípicas 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 del 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 los EEUU (<http://www.iasusa.org/>), o la base de datos para secuencias de proteasa y transcriptasa inversa de la

Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>). Todos son fácilmente accesibles, y presentan sistemas de interpretación sencillos para todas las drogas 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 especial para algunos análogos de nucleósidos como estavudina, abacavir, tenofovir y didanosina.

La realidad es que no todos los sistemas aportan la misma calidad a la interpretación. Para la elección del que vayamos a utilizar debemos valorar, entre otros, la fecha de la última actualización (en este sentido, los de la Red de Investigación en SIDA de España y los de la ANRS francesa-Julio 2005- son los de una actualización más reciente) y existen datos clínicos que avalan que ese algoritmo es capaz de predecir la eficacia virológica. La tendencia actual es la elaboración de reglas de interpretación a partir de series de pacientes en los que se incluye el fármaco a estudiar en el régimen terapéutico, relacionando las mutaciones basales con la eficacia virológica en términos de descenso de carga vírica a los tres meses. En este sentido existen datos publicados para tenofovir, didanosina, abacavir, saquinavir, atazanavir, fosamprenavir, lopinavir, y tipranavir. Además parece claro que la interpretación del genotipo debe estar avalada por un experto en la materia.

Finalmente, hay que destacar que es importante 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.

## 4.2. TÉCNICAS FENOTÍPICAS

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.

### 4.2.1. Método de sensibilidad del virus en células mononucleadas de sangre periférica (CMSP).

El análisis de resistencias fenotípicas puede hacerse a partir del aislamiento del virus del paciente procedente de CMSP. Para ello se estimulan las CMSP del paciente con fitohemaglutinina (PHA) y se co-cultivan en presencia de CMSP de donantes no infectados también estimuladas con PHA, todo ello en presencia de distintas concentraciones del antirretroviral. Semanalmente se renuevan las CMSPs de los donantes y en un tiempo aproximado de 4 semanas se evalúa la producción de nuevos virus. Como ventaja frente a la tecnología de virus recombinantes que veremos a continuación, hay que

destacar que se estima la sensibilidad del virus completo, pudiéndose reflejar el efecto de partes del genoma que se pueden subestimar al estudiar sólo el gen *pol*.

### 4.2.2. Técnicas con virus recombinantes

En 1994 Kellam y Larder publicaron un ensayo en el que se amplificaban mediante PCR la transcriptasa inversa y la proteasa (fragmento PR-TI) directamente a partir de muestras de plasma del enfermo y se transfectan en células huésped conjuntamente a un plásmido linearizado que codifica para una cepa de VIH de laboratorio en la que se ha eliminado esta secuencia. En la célula huésped tiene lugar un proceso de recombinación homóloga cuyo resultado es un VIH recombinante que porta las secuencias del gen *pol* del paciente y que además se puede cultivar con facilidad en el laboratorio. Este ensayo inicial se caracterizaba por una mayor rapidez y una mayor reproducibilidad en los resultados que el cultivo de CMSPs. Las posteriores modificaciones a este ensayo inicial han contribuido a mejorar aún más estos aspectos y han dado lugar a los tres ensayos de virus recombinantes que podemos solicitar a las casas que los comercializan: Antivirogram (Tibotec-Virco), Phenosense™ (Virologic) y Phenoscript™ (Viralliance-SAS).

En el método **Antivirogram® (Virco)** los virus recombinantes se preparan mediante transfección de células MT-4 con el producto amplificado PR-TI y con un plásmido que contiene el genoma completo del VIH salvo la región gag-pro-RT. La  $CI_{50}$  del virus recombinante se determina en cultivos, midiendo la viabilidad de células MT4 infectadas con el virus recombinante en presencia de diluciones de cada antirretroviral.

El método **Phenosense (ViroLogic)**, a diferencia del antivirograma, es un ensayo de un solo ciclo de replicación vírica, lo que reduce el tiempo para los resultados. Utiliza un proceso de ligación, más que de recombinación homóloga, para introducir el fragmento amplificado mediante RT-PCR en el genoma de una partícula de VIH en la que el gen *env* ha sido sustituido por un gen productor de luciferasa. En un ciclo de replicación este virus es capaz de producir todas las proteínas del VIH a excepción de las de envoltura y, en su lugar, se expresa el gen de la luciferasa. La  $CI_{50}$  del virus recombinante se determina cuantificando la expresión del gen de la luciferasa en cultivos de células infectadas con el virus recombinante en presencia de antirretrovirales.

El método **Phenoscript (Viralliance)**, combina aspectos de los dos anteriores: un proceso de recombinación homóloga, como en el antivirograma, con un sólo ciclo de replicación vírica, como en el Phenosense. Las células diana (P4) contienen el gen de la beta-galactosidasa controlado por la LTR del VIH de modo que cuando se acumulan suficientes productos del gen *tat* en la célula infectada, se expresa el gen de la beta-galactosidasa y su producto se puede medir mediante colorimetría o fluorimetría. La Figura 1 resume las características de estos tres ensayos.

### 4.2.3. Interpretación del fenotipo

Las técnicas fenotípicas se basan en la capacidad de los virus aislados del paciente de infectar células frescas en presencia de varias diluciones del antirretroviral a ensayar. La producción de nuevos virus se monitoriza mediante diversos métodos (cuantificando la generación de antígeno p24 o la actividad de la TI) y se puede calcular la cantidad de fármaco necesaria para que el crecimiento de virus se inhiba en un 50% o en un 90% (CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub> respectivamente). El mismo procedimiento realizado en cepas sin mutaciones de resistencia (cepas de referencia o cepas salvajes), permitirá conocer el número de veces que la CI<sub>50</sub> de la cepa en estudio está aumentada con respecto a la de referencia para así poder estimar la sensibilidad o resistencia a esa droga. Para ello se definirá un punto de corte (*cut-off*), que es distinto para cada antirretroviral en estudio. Existen distintos puntos de corte: técnico, biológico y clínico.

El **punto de corte técnico** se establece en base a la reproducibilidad del ensayo: sólo informa si la CI<sub>50</sub> 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. El **punto de corte biológico** se basa en la media de la CI<sub>50</sub> de cepas aisladas de pacientes *naive* y para cada antirretroviral, este punto de corte se estableció en dos desviaciones estándar por encima de la media de CI<sub>50</sub> de dichas cepas; este punto de corte es una buena medida de la sensibilidad del virus a los antiviricos en estudio con respecto a los que circulan en la población no tratada e infectada por el VIH pero tampoco proporciona ninguna medida en relación con si un tratamiento será efectivo o no. Por último, el **punto de corte clínico** se establece en base a la correlación de la CI<sub>50</sub> a un antirretroviral con la respuesta clínica medida en términos de descenso de la carga vírica 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, si no que esto más bien es un fenómeno continuo, por lo que se hace necesario definir intervalos que definan varias posibilidades de respuesta. En esta línea están trabajando los laboratorios que ofertan los ensayos fenotípicos.

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. Ha sido diseñado por *Virco*, que ha desarrollado una base de datos con información alrededor de 100.000 genotipos y fenotipos. En su versión inicial, existían unos 30.000

emparejamientos genotipo-fenotipo de las mismas muestras clínicas, que se utilizaban para generar un fenotipo virtual: cuando se obtiene el genotipo de la muestra de un paciente, el código genético de las regiones de la proteasa y TI es analizado por el *software* propio del sistema, que identifica todas las mutaciones que pueden afectar a la resistencia de cada droga y busca en la base de datos de *Virco* genotipos de muestras previas que presentan el mismo patrón de mutaciones. Cuando ya se han identificado todas ellas, el *software* recupera los fenotipos de esas muestras y para cada antirretroviral, hace un promedio de los datos. Esto produce el fenotipo virtual, con los cambios en la CI<sub>50</sub> para cada antirretroviral, basado en los datos de cientos o miles de fenotipos reales con el mismo patrón de mutaciones.

Esta técnica ha sufrido diversas modificaciones/actualizaciones. En Julio 2004 se incorporó información importante sobre tenofovir y 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.

El fenotipo virtual de *Virco* no es el único disponible y existen otras herramientas que predicen el fenotipo a partir del genotipo, como *geno2pheno* (<http://www.geno2pheno.de>).

### 4.4. INDICACIONES DE LAS PRUEBAS DE RESISTENCIA

En este apartado se expondrán las recomendaciones más recientes a nivel nacional (Gesida/Plan Nacional del SIDA, Octubre 2004) e internacional (Department of Health and Human Services, DHHS, Octubre 2005) que estos grupos de expertos realizan para conseguir una optima utilización de las pruebas de resistencia. Los escenarios para la utilización de las pruebas de resistencia son:

a) Pacientes sin tratamiento previo:

a. Infección aguda por el VIH: ambas guías recomiendan su empleo (DHHS, BIII) si se decide iniciar tratamiento, con el objeto de detectar la posible transmisión de cepas resistentes y modificar el régimen antes de que este fracase, evitando de este modo la terapia subóptima y una consecuente acumulación de resistencias. Las guías de la DHHS recomiendan (CIII) extender este período hasta 1-3 años de la seroconversión, debido a que determinadas mutaciones pueden llegar a detectarse durante este tiempo incluso en ausencia de presión farmacológica.

- b. Infección crónica por el VIH: según la DHHS, debe considerarse (CIII) su empleo antes de iniciar tratamiento sólo en aquellos pacientes en los que exista una elevada sospecha de haber sido infectados por una persona en tratamiento antirretroviral. Estas guías comentan un estudio en que la detección de resistencias en pacientes *naïve* es coste-eficaz cuando la prevalencia de resistencia en esta población es superior al 5%. Recientemente se ha publicado un nuevo estudio en que se demuestra que es coste-eficaz por encima del 1%.
- c. Embarazo: la guía nacional las recomienda para todas las mujeres embarazadas. Las de la DHHS consideran que para las mujeres embarazadas se deben hacer las mismas recomendaciones que para el resto de pacientes.
- d. Profilaxis postexposición (PPE) ocupacional: Gesida/PNS recomiendan considerar su utilización en el caso fuente.
- b) Paciente con tratamiento antirretroviral: recomendar en todo fracaso al TAR (DHHS, BII), para determinar el papel de la resistencia en el fracaso y diseñar un nuevo régimen con el mayor número de fármacos activos.

Las guías de la DHHS recomiendan además la realización de las pruebas de determinación de resistencias en los casos en los que la supresión virológica tras iniciar tratamiento es subóptima (BIII). Finalmente desaconsejan su empleo en pacientes con carga vírica <1000 copias/ml (DIIII), por el escaso rendimiento de la prueba, y después de suspender un tratamiento (DIIII), por la reversión de la mayoría de las mutaciones que no se detectarían al ser subpoblaciones minoritarias.

#### 4.5. LIMITACIONES DE LAS PRUEBAS DE RESISTENCIA

En la actualidad, la mayoría de las pruebas genotípicas o fenotípicas incluyen durante su realización la extracción del ARN vírico 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 el gen de la proteasa y parte de la TI 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 vírica superior a 500-1000 copias/ml. No obstante, con las adecuadas modificaciones es posible amplificar prácticamente cualquier muestra con carga vírica detectable, es decir, con más de 50 copias/ml. Por otra parte, ninguno de los métodos genotípicos o fenotípicos asegura la detección de todas las variantes o cuasiespecies víricas que infectan al paciente. La

mayoría de las técnicas sólo detectan una variante si esta 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 no son aplicables hoy por hoy a la rutina del laboratorio de secuenciación del VIH. Este hecho explica por qué los métodos que se utilizan 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. Finalmente, los ensayos de que disponemos 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 URFs (Unique Recombinant Forms) o CRFs (Circulating Recombinant Forms).

En la Tabla 11 (después de Bibliografía) se recogen las principales ventajas e inconvenientes de los métodos genotípicos y fenotípicos.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA:

- Ortiz de Lejarazu R, Ortega M, Hernández B, Eiros JM, Labayru C, Rodríguez-Torres A. Detection of primary HIV infection with a fourth generation test. *AIDS* 2000; 14 (S-4): 108-112.
- WHO. AIDS. Proposed WHO criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2 and HTLV-I/HTLV-II. *Weekly Epidem Rec* 1990; 65:281-283.
- CDC. US Public Health Service guidelines for testing and counselling blood donors and plasma donors for HIV type 1. *MMWR* 1996; 45:3-8.
- Sullivan PS, Schable Ch, Koch W, et al. Persistently negative HIV-1 antibody enzyme immunoassay screening results for patients with HIV-1 infection and AIDS: serologic, clinical, and virologic results. *AIDS* 1999; 13:89-96.
- Preiser W, Brink NS, Hayman A, et al. False-negative HIV antibody test results. *J Med Virol* 2000; 60:43- 47.
- Bartlett JG, Gallart JE. Medical management of HIV infection. Johns Hopkins University 2003. Baltimore, MD
- Simon V, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1:181-190.
- Nettles RE, Kieffer TL, Kwon P, et al. Intermittent HIV-1 viremia (Blips) and drug resistance in patients receiving HAART. *JAMA* 2005; 293:817-829
- Fiscus SA, Brambilla D, Coombs RW, et al. Multicenter evaluation of methods to quantitate human immunodeficiency virus type 1 RNA in seminal plasma. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2348-2353.
- Pilcher C D, Fiscus S A, Nguyen T Q, et al. Detection of acute infections during HIV testing in North Carolina. *N Engl J Med* 2005; 352:1873-1883.
- García F, Aguilera A. Pruebas de resistencia. En: "Resistencia a los antirretrovirales 2005". Ed. Soriano V. Publicaciones Permmayer.
- Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:247-277.
- García F, Palomares JC, Martínez NM, et al. Study of different system for interpreting results of genotypic

antiretroviral drug resistance tests. Antiviral Therapy 2003; 8:251-252.

14. Iribaren JA, et al. 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.

15. 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>. Octubre, 2005.

**Tabla 11.** Principales ventajas e inconvenientes de los métodos genotípicos y fenotípicos

<b>Métodos genotípicos: ventajas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapidez</li> <li>• Dificultad técnica media: realizable en laboratorios hospitalarios</li> <li>• Menor coste económico</li> <li>• Las mutaciones pueden preceder a las resistencias fenotípicas</li> </ul>
<b>Métodos genotípicos: desventajas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Algunos no detectan variantes minoritarias (han de constituir al menos un 20% de la población vírica)</li> <li>• Puede no existir correlación con el análisis fenotípico</li> <li>• Desconocimiento de mutaciones que ofrecen resistencia a diferentes inhibidores</li> <li>• Desconocimiento del efecto de las resistencias cruzadas</li> <li>• Respuesta variable de los pacientes a un fármaco</li> <li>• Marcador indirecto de la sensibilidad del VIH a los antirretrovirales</li> <li>• Requieren la interpretación por un experto</li> <li>• No son válidos para nuevas drogas hasta que se diseñan los algoritmos de interpretación y se validan clínicamente.</li> </ul>
<b>Métodos fenotípicos: ventajas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reflejan el efecto de todas las mutaciones presentes, incluso las que no se han descrito</li> <li>• Medida directa de la sensibilidad del VIH a los antirretrovirales</li> <li>• Se puede utilizar para cualquier tipo de fármaco</li> <li>• Información útil acerca de las resistencias cruzadas</li> <li>• Los resultados son fáciles de interpretar</li> <li>• Potencial medida de "fitness" vírico y tropismo</li> </ul>
<b>Métodos fenotípicos: desventajas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No detecta variantes minoritarias</li> <li>• Lento, laborioso y de elevado coste</li> <li>• Falta de estandarización</li> <li>• No están validados o no se han descrito todos los puntos de corte clínicos</li> <li>• Medidas de contención biológica</li> <li>• Posible selección de variantes víricas mejor adaptadas al cultivo celular</li> </ul>



Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Diagnóstico serológico de la infección por el VIH</b>	<b>PNT-VIH-01</b>	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

## 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.

Las técnicas de detección primaria de marcadores han evolucionado en cuatro generaciones:

- Enzimoimmunoanálisis de primera generación, que detectan anticuerpos empleando como soporte antigénico lisado vírico del VIH-1.
- Enzimoimmunoanálisis de segunda generación. En ellas se detectan anticuerpos empleando como antígenos péptidos recombinantes del VIH-1 y VIH-2.
- Enzimoimmunoanálisis/ELFA 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 (*outlayer* o marginal).
- Enzimoimmunoanálisis/ELFA de cuarta generación. Se emplean como soporte tanto péptidos recombinantes/sintéticos del VIH-1 (incluyendo al grupo O) como anticuerpos para detectar antígeno p24.

La técnica de confirmación de anticuerpos frente al VIH más empleada es el Western Blot (WB). Básicamente utiliza como soporte en tiras de nitrocelulosa antígenos del propio VIH, algunas de sus proteínas precursoras y antígenos de origen celular. Existen sistemas que incorporan en un extremo diferenciado de la tira un péptido sintético específico del VIH-2. Mediante un sistema de revelado se identifican bandas de reactividad específica que conducen a la interpretación del resultado.

## 3. MUESTRAS

La muestra adecuada para la determinación de marcadores de infección por el VIH es el suero. También pueden utilizarse con fines de cribado otras

muestras biológicas. Las condiciones para la para la recogida y el transporte de suero deben contemplar:

- Centrifugar el tubo de sangre a 1000-1500g (generalmente equivale a 2000-2500 rpm) durante 10 minutos.
- En condiciones habituales se debe transferir el suero a tubos con tapón de rosca de 5 ml de capacidad y evitar mantenerlos a temperatura ambiente durante más de 24 horas.
- Identificar correctamente el tubo (código empleado, referencia en origen y fecha de extracción).
- Para minimizar las contaminaciones microbianas que podrían alterar las muestras se recomienda no prolongar la conservación a 4°C más allá de 72 h. Si la determinación se difiere a fechas posteriores o se almacenan las muestras para archivo se recomienda congelación que debe ser a -70°C para períodos prolongados.

## 4. PROCESAMIENTO

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. En todo caso la técnica utilizada en primera instancia debe ser la que posea la máxima sensibilidad y las siguientes deben optimizar la especificidad.

## 5. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan en términos cualitativos de positivo o negativo. Es aconsejable disponer de al menos dos técnicas de cribado de anticuerpos frente al VIH y utilizar un método de confirmación con muestras del mismo paciente tomadas en momentos diferentes.

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.

## 6. 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.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	Diagnóstico serológico de la infección por el VIH	PNT-VIH-01	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

## 7. 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.

## 8. 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 ocurren cambios en la dinámica de producción de anticuerpos desde el momento de la seroconversión. El período *ventana* de dos a cuatro semanas de duración se caracteriza por la ausencia de anticuerpos y la presencia de antígeno p24. 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.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. HIV assays: operational characteristics (Phase 1) report 15 antigen/antibody ELISAs. Geneva, 2004. Disponible en [http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/evaluations/hiv/en](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/hiv/en).
2. Ortiz de Lejarazu R, Cisterna R, Eiros JM, González A, Maroto MC, Pumarola T, Romero J. Diagnóstico Microbiológico de la infección por el VIH. En: Picazo JJ, ed. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid, 1998, número 6.



Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Determinación de la carga vírica plasmática (CVP) del VIH-1</b>	<b>PNT-VIH-02</b>	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

### 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la determinación de carga vírica 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 envíen muestras a laboratorios de referencia.

### 2. FUNDAMENTO

Una vez purificado el ARN de las partículas víricas circulantes en plasma, las diferentes técnicas utilizan RT-PCR, u otro procedimiento de biología molecular como bADN o NASBA, para amplificar una región conservada de HIV-1. La purificación y amplificación se realizan simultáneamente con una cantidad prefijada de un control cuya señal puede diferenciarse con sondas específicas de tal forma que permite una cuantificación precisa.

La técnica de determinación de la CVP consta de las siguientes fases:

- Fase de extracción de ácidos nucleicos, a partir de muestras de plasma.
- Fase de retro-transcripción y amplificación. En las técnicas basadas en RT-PCR el ARN liberado de las muestras es transcrito en cADN y posteriormente se amplifica mediante el uso de primers específicos. La técnica de bADN consiste en una hibridación de este ARN a pocillos con sondas homólogas para detectarse posteriormente con sondas ramificadas marcadas con un enzima que actúa sobre un sustrato luminiscente. La técnica de NASBA amplifica directamente a partir del ARN por un procedimiento isoterma.

### 3. MUESTRAS

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

- Centrifugar el tubo de sangre a 1000-1500g (generalmente equivale a 2000-2500 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de las 6 horas siguientes a su obtención.
- En condiciones asépticas (se recomiendan pipetas Pasteur estériles), transferir 1 mL de plasma a criotubos con tapón de rosca de 1,5 mL de capacidad (3 ó 4 dependiendo del volumen de muestra y de las necesidades de archivo)
- Identificar correctamente (iniciales del paciente, referencia en origen y fecha de extracción) los criotubos.
- La CVP del VIH-1 del plasma separado es estable durante 24 horas a temperatura ambiente y durante 6 días a 4°C. Si la determinación se difiere a fechas posteriores o se almacenan las muestras para archivo se recomienda congelación.

- Congelar inmediatamente a -70°C o en hielo seco para transporte. Mantener a -70°C para almacenamiento a largo plazo.

### 4. PROCESAMIENTO

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.

### 5. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

Los resultados se expresan como copias del VIH-1 por mililitro de plasma. Es recomendable ofrecer simultáneamente el equivalente en logaritmo decimal de la CVP por la frecuencia de recomendaciones que están basadas en esta escala.

### 6. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del Laboratorio de Microbiología Molecular 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.

### 7. 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.

La exigencia tradicional de división de áreas para las técnicas de amplificación es mucho menos crítica para algunas de las técnicas actuales, fundamentalmente las basadas en PCR en tiempo real, ya que no es necesario manipular el producto amplificado al realizarse la detección en el mismo tubo de amplificación mientras se lleva a cabo el procedimiento.

### 8. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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 cp/mL en lugar de <50. De la misma manera se debe multiplicar cualquier resultado positivo por el factor

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Determinación de la carga vírica plasmática (CVP) del VIH-1</b>	<b>PNT-VIH-02</b>	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

de dilución, 5 en este caso, para normalizar la CVP a 1 mL.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bartlett J.G., Gallart J.E. Medical management of HIV infection. Johns Hopkins University 2003. Baltimore, MD.



Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a antirretrovirales</b>	<b>PNT-VIH-03</b>	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

### 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica de las fases preanalíticas y postanalíticas para la determinación de resistencias a antirretrovirales 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 del gen *pol* (proteasa y transcriptasa reversa) y localizar los cambios de aminoácidos relacionados con la resistencia a los fármacos antirretrovirales.

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 cADN y posteriormente se amplifica mediante el uso de primers específicos el gen *pol* del VIH-1.
- Fase de secuenciación: El producto amplificado se somete a una nueva amplificación con concentraciones limitantes de dideoxinucleótidos (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 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. 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 ó 4 dependiendo del volumen de muestra).
- Identificar correctamente (iniciales del paciente, referencia en origen y fecha de extracción) los criotubos.
- Congelar inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  o en su defecto a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- 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.

### 4. PROCESAMIENTO

Existen diversos métodos comerciales para la realización de la técnica, que no se van a describir en este procedimiento. Se recomienda ceñirse estrictamente al protocolo 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.

Además, existen métodos caseros o "in house" para la secuenciación de la proteasa y de la transcriptasa inversa (TI) del 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.

### 5. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

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

- Se necesita una secuencia bidireccional al menos desde los codones 10 a 94 de la proteasa y 41 a 236 de la TI.
- 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 (ejemplo: <http://hivdb.stanford.edu/>).
- 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 indican una posible contaminación. Este procedimiento permitirá

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a antirretrovirales</b>	<b>PNT-VIH-03</b>	
		Edición N° 01	Página 3 de 3

además establecer vínculos epidemiológicos en la transmisión de cepas entre distintos pacientes.

- En el informe de resultados se debe proporcionar la lista de mutaciones en la transcriptasa inversa y en la proteasa, 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.
- Se recomienda no tener una demora en la emisión de resultados superior a 10 días.

## 6. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del Laboratorio de Microbiología Molecular 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.

## 7. 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 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.

## 8. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La sensibilidad de la técnica se ve disminuida en gran medida cuando se emplean muestras con carga vírica <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.

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.

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

## 9. 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>. Octubre, 2005.
4. Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. Clin Microbiol Rev 2002; 15:247-277.