

Controls de laboratori en l'adult infectat per l'HIV

T. PUMAROLA

La infecció per l'HIV és un procés crònic d'anys de durada, essent l'expectativa dels pacients tractats cada vegada més gran. El maneig clínic dels pacients infectats per l'HIV ha augmentat en complexitat en els últims anys. Els avenços farmacològics en el tractament de la infecció han obligat, des del punt de vista del laboratori, al desenvolupament i posta a punt de tècniques amb capacitat de predir la progressió de la infecció, per establir el moment idoni de l'inici del tractament, i que permetin avaluar l'eficàcia de les complexes i costoses pautes de tractament antiretroviral.

Els objectius que persegueix el tractament antiretroviral són obtenir la màxima supressió de la replicació viral i evitar el deteriorament immunològic amb la finalitat de detenir la progressió de la malaltia i augmentar la supervivència. Tanmateix, l'adhesió al tractament, la farmacocinètica i el desenvolupament de resistències farmacològiques són problemes importants que conduiran al fracàs terapèutic.

El maneig clínic dels pacients infectats per l'HIV ha de sistematitzar-se i efectuar-se de forma periòdica a partir d'una conjunció de criteris clínics, immunològics i virològics, essent el pes específic de les dues últimes cada vegada més gran i a les que dedicarem aquest capítol.

CRITERIS IMMUNOLÒGICS

Els limfòcits CD4+ són la principal cèl·lula diana de l'HIV. El seu comptatge reflecteix l'efecte citopàtic víric. Després de la primoinfecció, la xifra de limfòcits CD4+ baixarà a major o menor velocitat (en anys) en més del 90% de pacients. Si la xifra no baixa bruscament és per la gran capacitat de regeneració d'aquesta població cel·lular. En general, cada any es perden una mitjana de 60 a 100 limfòcits CD4+. Es considera immunodepressió greu quan el percentatge o el quocient CD4/CD8 és menor de 200/ml, 15% o 0,3, respectivament (VN, 1000 ± 400 /ml, $51 \pm 5\%$, $2,1 \pm 0,9$).

Una vegada s'inicia el tractament antiretroviral, l'objectiu és aconseguir l'augment màxim de la xifra de limfòcits CD4+ durant el major temps possible. En general el tractament antiretroviral produeix un augment de la xifra de limfòcits CD4+ ($50/\mu\text{l}$ a $200/\mu\text{l}$, 10% a 100%) que és màxima a les 4 a 12 setmanes i que varia segons l'estat immunològic basal del pacient i el tipus de tractament. Aquest increment de limfòcits CD4+ en les primeres setmanes d'inici del tractament antiretroviral és conseqüència d'una redistribució del fenotip memòria del compartiment limfàtic perquè, a partir dels 3 a 6 mesos, augmenti el fenotip *naïve* d'origen tímic. Així mateix, es restaura la resposta proliferativa enfront de mitògens i antígens memòria, a excepció de l'HIV, això permet suspendre les profilaxis de les infeccions oportunistes. Paral·lelament a l'augment de limfòcits CD4+, hi ha una disminució dels limfòcits CD8+ i dels marcadors d'activació del sistema immunològic, que reflecteixen la disminució de la virèmia en plasma i teixit limfàtic.

El monitoratge de la xifra absoluta de limfòcits CD4+ és, actualment, un important marcador biològic de referència per al maneig dels pacients infectats per l'HIV, essent de gran utilitat com a indicador d'inici del tractament antiretroviral, per avaluar la seva eficàcia i per indicar l'inici de la profilaxi de les infeccions oportunistes. Tanmateix, malgrat el seu elevat pes específic, és important tenir en compte que aquest marcador té moltes limitacions (Taula 1). Existeix una variabilitat fisiològica i tècnica important si tenim en compte que el seu valor exhibeix un rang limitat (aproximada-

TAULA 1.

Limitacions de la determinació de la xifra de limfòcits CD4+.

La xifra de limfòcits CD4+ de sang perifèrica correspon al 2% del total de limfòcits CD4+, que es localitzen fonamentalment en els òrgans limfoides.

Càlcul de la xifra de limfòcits CD4+

S'obté multiplicant la xifra absoluta de leucòcits per μl o ($\times 10^6/\text{l}$) pel percentatge de limfòcits i pel percentatge de limfòcits CD4+. La xifra absoluta i percentatge normals de CD4+ oscil·len entre 600 i 1200/ μl i $51 \pm 5\%$, respectivament.

Exemple: Si un pacient té 10.000 leucòcits/ μl , un 30% de limfòcits i el percentatge de CD4+ és del 30%, la xifra absoluta de limfòcits CD4+ serà:

$$10.000 \times 0,30 = 3000 \text{ limfòcits}/\mu\text{l}; 3000 \times 0,30 = 900 \text{ CD4+}/\mu\text{l}$$

Relació entre la xifra absoluta i percentatge de CD4+

Existeix una bona relació entre el número absolut i el percentatge de limfòcits CD4+ en els pacients infectats per l'HIV: els pacients amb $<14\%$ de limfòcits CD4+ tenen menys de 200/ mm^3 ; entre 14% a 28% tenen entre 200 i 500; i els pacients amb $>28\%$ tenen més de 500 limfòcits CD4+/ mm^3 .

Relació entre la xifra absoluta de limfòcits i de CD4+

En general, els pacients amb menys de 1500 limfòcits totals tenen menys de 500 limfòcits CD4+/ μl . Per contra, els pacients amb més de 1500 limfòcits CD4+ solen tenir més de 200 limfòcits CD4+/ μl .

Limitacions:

- La xifra de leucòcits i limfòcits és variable a diferents hores del dia i de dia a dia, i pot ser influenciada per nombrosos factors. La variabilitat de la xifra de leucòcits utilitzant mètodes automatitzats oscil·la entre el 2% i el 8%. La variabilitat de la xifra de limfòcits utilitzant mètodes automatitzats o manuals oscil·la entre el 2% i el 5%, i el 12% i 27%, respectivament.
- La determinació del percentatge de limfòcits CD4+ es realitza generalment per citometria de flux (FACS) utilitzant anticossos monoclonals marcats amb fluoresceïna. Els resultats tenen una gran variabilitat entre diferents laboratoris, sobretot quan la determinació no s'efectua diàriament ni es realitzen controls de qualitat. Els dos principals problemes tècnics que originen errades en els resultats són una demora superior a 24 hores entre l'obtenció de la mostra i el seu processament, i la refrigeració de la sang, que origina una unió inespecífica dels anticossos monoclonals, tenint com a resultat percentatges de CD4+ anormalment alts.

Situacions que originen alteracions de la xifra de limfòcits i de les subpoblacions limfocitàries:

- *Tabaquisme:* la nicotina disminueix la xifra de limfòcits, tot i que algun article ha indicat que els fumadors poden tenir xifres elevades de limfòcits totals i CD4+.
- *Corticoides:* disminueixen la xifra de limfòcits totals i de CD4+.
- *Exercici intens:* disminueix la xifra de limfòcits totals i de CD4+.
- *Variacions diürnes:* canvis de la xifra de limfòcits totals i de CD4+, amb xifres més elevades durant el dia (50-150 elements/ mm^3).
- *Esplenectomia:* Augment important de la xifra de limfòcits totals i de CD4+. El percentatge de CD4+ és el paràmetre que ha d'utilitzar-se per al control clínic dels pacients.

(Continua)

TAULA 1.

Limitacions de la determinació de la xifra de limfòcits CD4+. (Continuació)

- *Embaràs*: En el tercer trimestre la xifra de limfòcits CD4+ és menor que a les 6 setmanes del part, tot i que el percentatge de limfòcits CD4+ és similar.
- *Processos aguts*: En els processos aguts d'origen infecciosos o no (pneumònia, pancreatitis, etc.), la xifra absoluta de CD4+ disminueix ja que sol existir limfocitopènia.

Implicacions:

Totes aquestes alteracions fan que la xifra de limfòcits CD4+ hagi d'interpretar-se amb cautela i que per prendre decisions terapèutiques importants hagi de repetir-se dues o tres vegades aquesta determinació. Aquests canvis són de menor magnitud quan la infecció per l'HIV és avançada i la xifra de CD4+ baixa.

ment $2 \log_{10}$). Per això els seus canvis han d'interpretar-se amb cautela abans de prendre cap decisió terapèutica, recomanant-se repetir la determinació de la xifra de limfòcits CD4+ com a mínim una vegada.

Altres marcadors pronòstics són els marcadors immunofenotípics d'activació com el CD8+ CD38+ (com més elevat, pitjor pronòstic) i els marcadors de reserva tímica (TREC). Actualment s'estan avaluant altres factors, que serviran com a marcadors pronòstics i de resposta al tractament antiretroviral, com són la resposta proliferativa enfront d'antígens de record, de mitògens i del propi HIV, o la resposta TH1 i TH2.

CRITERIS VIROLÒGICS

En el maneig clínic dels pacients de sida i dels infectats per l'HIV-1, la freqüència i gravetat d'infeccions fonamentals de tipus oportunista i la pròpia etiologia vírica de la malaltia han exigint, des de la descripció de la sida, d'una estreta col·laboració amb els serveis de microbiologia clínica. Tanmateix, un dels majors reptes per als laboratoris de virologia clínica ha vingut de la mà de les tècniques específiques de detecció i quantificació de l'HIV-1.

Des de la primoinfecció per l'HIV-1, la replicació vírica és contínua i extraordinàriament elevada, produint-se i eliminant-se diàriament una

mitjana de 10^{10} nous virions. El nivell de virèmia basal propi de cada pacient s'estableix immediatament després de la seroconversió i reflecteix l'equilibri entre la virulència de les soques infectades i la intensitat de la resposta antiviral generada per l'hoste. La caiguda de limfòcits CD4+ passa fonamentalment com a conseqüència directa de la replicació de l'HIV-1. Així, el nivell de virèmia representa una dada d'enorme valor pronòstic en l'evolució de la infecció, ja que indica l'equilibri aconseguït en un determinat pacient entre el virus i el seu sistema immunitari, especialment quan la xifra de limfòcits CD4+ encara no està reduïda. Després de l'administració del tractament antiretroviral es produeix una profunda reducció dels nivells circulants de virions i una elevació "en mirall" de la xifra de limfòcits CD4+.

Els mètodes de laboratori han experimentat un desenvolupament important en els últims anys. Fins fa poc temps els mètodes més utilitzats per quantificar la quantitat de virus circulants eren la determinació de l'antigen p24 o la semiquantificació dels nivells circulants de l'HIV-1 per cultiu i dilucions a punt final. Tanmateix, aquests mètodes eren poc sensibles en pacients amb més de 200 limfòcits CD4+/ μ l i el segon, a més a més, bastant complex. Malgrat això, l'antigenèmia p24 quantitativa, dissociada o no en plasma o sèrum, continua essent un mètode utilitzat en la pràctica clínica, encara que quasi exclusivament en el cribatge del període finestra durant la primoinfecció per l'HIV-1.

A mitjans de la dècada dels noranta el desenvolupament d'una tècnica d'amplificació genètica que quantificava el nombre de còpies d'RNA-HIV-1 per ml de plasma (càrrega viral), en qualsevol fase de la infecció, va permetre assentar les bases dels actuals coneixements sobre la patogènia de la infecció per l'HIV-1. Però a més, va resultar ésser una eina capaç d'establir el valor pronòstic de la infecció, el moment idoni de l'inici del tractament antiretroviral i l'eficàcia terapèutica.

Recentment, un nou desenvolupament tecnològic, el genotipat de l'HIV-1, que permet, a través de la seqüenciació de determinats gens, la detecció de mutacions que confereixen resistència als fàrmacs antiretrovirals, ha tornat a suposar un important repte per als laboratoris de viro-

logia clínica. Diversos assajos clínics han demostrat recentment la utilitat del genotipat a curt termini en l'optimització del tractament antiretroviral, recomanant-se actualment la seva utilització en el maneig clínic dels pacients.

Càrrega viral

La càrrega viral és una prova que quantifica el nombre de còpies d'RNA de l'HIV-1 (i no de l'HIV-2) com a indicador del nivell de replicació viral (cada virió conté dues còpies d'RNA viral). Es realitza fonamentalment en plasma i els resultats s'expressen en nombre de còpies per ml o bé la seva equivalència \log_{10} .

Existeixen tres mètodes comercials per a la determinació de la càrrega viral: *HIV RNA PCR* (Amplicor HIV-1 Monitor, Roche Molecular Systems), *branched chain DNA* o *bDNA* (Quantiplex HIV RNA Assay, Chiron) i *Nucleic acid sequence-based amplification* o *NASBA* (Nuclisens, Organon Teknika). Encara que les tècniques disponibles inicialment (primera generació) detectaven només a partir de 10.000 còpies/ml, les tècniques més utilitzades en l'actualitat (segona generació) tenen un límit inferior de detecció de 200 a 400 còpies/ml. Actualment es troben disponibles les tècniques de tercera generació, que aconseguen detectar entre 20 i 50 còpies/ml. Aquesta major sensibilitat es deu a l'augment del volum de la mostra i al fet que es centrifuga a major velocitat i durant més temps. Entre aquestes tècniques de tercera generació s'inclouen: *Roche Ultrasensitive HIV RNA Amplicor HIV-1 Monitor version 3.0*; *Chiron bDNA Quantiplex version 3.0* i *NASBA* o *Nuclisens version 2.0* (Taula 2). És important destacar que no existeix una equivalència directa entre els resultats obtinguts mitjançant els diferents mètodes comercials, i que cada mètode de detecció i, especialment, cada generació de tècniques de detecció de la càrrega viral té un particular límit dinàmic de detecció, fora del qual els valors perden la seva fiabilitat. Així mateix, és important conèixer que les actuals tècniques poden presentar problemes en la quantificació de la càrrega viral en aquells pacients infectats per subtipus de l'HIV-1 diferents al B.

TAULA 2.

Característiques principals dels mètodes comercials per a la determinació de la càrrega viral.

Tècnica	RT-PCR	NASBA	bDNA
Mostra	Plasma	Plasma	Plasma
Anticoagulant	ACD/EDTA	ACD/EDTA/heparina	EDTA
Complexitat	Mitjana	Alta	Mitjana
Tramesa de mostres	Separar plasma abans de 6 h. Congelar a -80 °C Enviar congelat en gel sec		
<i>2a Generació</i>			
Límit dinàmic	400-750.000 còpies/ml	400-10 m còpies/ml	500-1 milió còpies/ml
Comparació de resultats	dues vegades més gran que amb bDNA	10-30% més gran que amb RT-PCR	50% inferiors als de RT-PCR
Volum mostra	0,5ml	1-2 ml	0,5 ml
<i>3a Generació</i>			
Límit dinàmic	50-50.000 còpies/ml	40-10 m còpies/ml	50-500.000 còpies/ml
Comparació de resultats	1,6 vegades inferior a bDNA	No està ben definit	1,6 vegades superior a RT-PCR
Volum mostra	0,5 ml	2 ml	1 ml

El principal objectiu del tractament antiretroviral és mantenir els valors de la càrrega viral per sota dels límits de detecció de la tècnica (20 a 50 còpies RNA-HIV-1/ml de plasma). La replicació viral (reflectida per la càrrega viral plasmàtica) és el "motor" que imposa una velocitat de progressió a sida, per això el seu valor és determinant tant per al pronòstic com per a la decisió d'inici i valoració de l'eficàcia del tractament antiretroviral. Això fa que sigui necessari sotmetre el pacient, amb o sense tractament antiretroviral, a un monitoratge constant de la càrrega viral.

La càrrega viral plasmàtica total és la resultant de l'equilibri entre els diferents compartiments virals (cel·lulars i orgànics). El descens de la càrrega viral plasmàtica després d'instaurar el tractament antiretroviral consta de tres fases, això és reflex de la contribució dinàmica dels diferents compartiments cel·lulars i de l'efecte del tractament en cada un d'ells. La càrrega viral plasmàtica baixa ràpidament (1 a 2 \log_{10} /ml de plasma) després d'iniciar el tractament antiretroviral, i el nadir que s'obté a les 4 a 8 setmanes es correlaciona amb la durabilitat de la resposta. Les concentracions indetectables de la càrrega viral per les tècniques con-

vencionals (<500/<200 còpies/ml) i ultrasensibles (<50/<20 còpies/ml) es solen obtenir als 3 a 4 mesos i als 4 a 6 mesos, respectivament. Així, sembla raonable mesurar la càrrega viral al mes d'haver-se iniciat el tractament i, després, cada 3 o 4 mesos.

Si bé la càrrega viral és un marcador de gran estabilitat, existeix una variabilitat biològica d'aproximadament $0,3 \log_{10}$. Així, es consideren significatius els canvis de més de $0,5 \log_{10}$ còpies RNA-HIV-1/ml. No han d'efectuar-se determinacions de la càrrega durant el mes següent a un estímul immunològic com pot ser una malaltia infecciosa aguda o una vacunació (tètanus, pneumococ, grip o hepatitis), ja que es produeix un augment transitori de la càrrega viral, que en alguns casos pot arribar a ser de 300 vegades els valors basals. Evidentment, si el pacient abandona el tractament o bé aquest fracassa, la càrrega viral augmentarà.

La determinació de la càrrega viral en altres territoris, com el teixit limfàtic, el líquid cefaloraquídi i el semen, per ara, no sembla que hagin d'ésser incorporades a la rutina clínica habitual.

Mètodes de laboratori per a la detecció de resistències als fàrmacs antiretrovirals

El fracàs del tractament antiretroviral és un dels principals motius de preocupació en el maneig del pacient infectat per l'HIV-1. Els últims avenços en teràpia antiretroviral no han aconseguit evitar, en un grup substancial de pacients, el retorn a nivells quantificables de la càrrega viral. Els diversos factors que poden contribuir al fracàs terapèutic són: falta de compliment, potència farmacològica limitada, farmacocinètica subòptima, activació farmacològica deficient i resistència vírica. El coneixement del factor o factors causants del fracàs terapèutic en un pacient determinat i la seva prevenció és un important repte de futur.

Una de les principals causes del fracàs terapèutic és l'habilitat de l'HIV-1 per desenvolupar mutacions de resistència als fàrmacs antiretrovirals, limitant les opcions terapèutiques futures i complicant significativament el maneig d'aquesta infecció. En la infecció per l'HIV-1, diverses

variants genètiques poden coexistir en un mateix pacient. Aquesta heterogeneïtat del virus ha estat descrita amb el nom de “quasiespècies” o “polimorfisme poblacional”, i s’han descrit diferències superiors al 25% en la seqüència de nucleòtids de les diferents quasiespècies presents en un mateix subjecte infectat. Aspectes de la variabilitat genètica de l’HIV-1 poden influir en el seu poder patogen i virulència, essent causants de l’aparició de soques amb major capacitat replicativa i lesional o bé amb diferent tropisme cel·lular. A més, la variabilitat genètica de l’HIV-1 pot modificar la sensibilitat de determinades soques als fàrmacs antiretrovirals.

La font de la variabilitat de la població vírica en un mateix pacient és la falta de correcció dels errors que es produeixen en la síntesi del DNA províric durant el procés de transcripció inversa, conjuntament amb fenòmens de recombinació genètica. Tanmateix, aquesta falta de correcció, similar a la de la majoria de virus RNA, no explica l’extraordinària variabilitat de l’HIV-1. Actualment, s’ha demostrat que des de la primoinfecció l’HIV-1 es caracteritza per una elevada cinètica de replicació i un ràpid recanvi víric. Sobre la base d’una producció diària de 10^{10} virions i un índex de mutació de $3,4 \times 10^{-5}$ per nucleòtid, es garanteix l’existència prèvia de pràcticament qualsevol mutació. A l’inici del tractament antiretroviral, si no s’obté una adequada activitat farmacològica, es produirà un sobrecreixement i predomini de les variants resistents que, en absència del tractament, solen trobar-se en minoria en relació amb el conjunt de quasiespècies d’un pacient determinat. S’ha demostrat que els pacients que a conseqüència del tractament obtenen i mantenen nivells de càrrega viral per sota de les 50 còpies RNA-HIV-1/ml de plasma durant un any, presenten la major duració d’eficàcia terapèutica, ja que eviten o alenteixen l’aparició de variants resistents com a conseqüència de la baixa activitat replicativa del virus i en conseqüència de la baixa mutabilitat vírica.

Els mètodes de laboratori per a la determinació de resistències de l’HIV-1 als antiretrovirals es classifiquen en dos grups: mètodes genotípics i mètodes fenotípics. Els mètodes genotípics es troben disponibles en laboratoris d’investigació, en laboratoris assistencials i en laboratoris comercials. Els mètodes fenotípics es troben quasi exclusivament en laboratoris comercials.

Mètodes genotípics

Els mètodes genotípics es basen en l'anàlisi de seqüències específiques del genoma de l'HIV-1 amb la finalitat de comprovar si existeixen mutacions associades a la resistència als antiretrovirals. En general, els mètodes genotípics inclouen com a primer pas l'amplificació de seqüències virals a partir de mostres clíniques mitjançant la utilització de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Quan la mostra que s'ha d'analitzar és plasma (com succeeix habitualment), abans de la PCR s'ha d'extreure l'RNA viral i, a partir d'aquest, sintetitzar DNA mitjançant una reacció de retrotranscripció. El DNA obtingut així és el que s'utilitza per amplificar seqüències virals mitjançant la PCR (reacció RT-PCR). La seqüència dels productes de les PCR (que representen seqüències virals) pot analitzar-se utilitzant diferents mètodes. Els més comuns són els mètodes de seqüenciació i la detecció de mutacions puntuals.

Seqüenciació

La seqüenciació és el mètode genotípic de referència per a la determinació de la resistència de l'HIV-1 als antiretrovirals. Amb els mètodes de seqüenciació s'obté informació completa sobre la seqüència de la regió del genoma viral amplificada prèviament mitjançant PCR. La disponibilitat de seqüenciadors automatitzats ha simplificat de forma considerable aquests mètodes. En aquests seqüenciadors s'utilitzen encebadors (*primers*) i dideoxinucleòtids (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) marcats de forma diferent per poder distingir-los. Els productes de les reaccions de seqüenciació se sotmeten a electroforesi en gel i les bandes que s'obtenen (cada una representant un dels quatre nucleòtids o bases A, T, G o C) són llegides pel seqüenciador. El resultat és una seqüència de nucleòtids que, una vegada editada, produeix una seqüència d'aminoàcids. Aquesta seqüència d'aminoàcids es compara llavors amb la d'una soca de referència de l'HIV-1 (també anomenada soca de consens) amb la finalitat de determinar si existeixen mutacions. En el moment actual els mètodes genotípics s'utilitzen fonamentalment per analitzar les seqüències de la

transcriptasa inversa i de la proteasa de l'HIV-1, si bé aquests poden utilitzar-se per analitzar la seqüència de qualsevol regió del genoma de l'HIV-1 (*gag-pol cleavage*, *integrasa*, *env*, etc.).

Entre els mètodes de seqüenciació que més s'utilitzen per a la determinació de resistències de l'HIV-1 als antiretrovirals s'inclouen tècniques desenvolupades pel propi laboratori i sistemes comercialitzats. Aquests últims inclouen l'*HIV Genotyping System* (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Califòrnia) i el *TruGene HIV-1 Genotyping System* (Visible Genetics, Canadà) (Taula 3).

Detecció de mutacions puntuals: hibridació mitjançant sondes específiques (LiPA)

El mètode *Line Probe Assay* o *LiPA* (Innogenetics, Bèlgica) es basa en el principi de la hibridació de productes amplificats mitjançant PCR amb sondes específiques distribuïdes en una tira de nitrocel·lulosa. Aquest mètode requereix, en primer lloc, l'extracció i amplificació prèvies de l'RNA de la mostra de plasma mitjançant tècniques d'RT-PCR que rendeixen productes d'amplificació marcats amb biotina. La hibridació es duu a terme en condicions molt restrictives, de manera que poden detectar-se tant els codons sense mutacions com aquells que presenten mutacions específiques. En cas d'hibridació, es produeix una reacció immunoenzimàtica que mostra una banda color bru-violeta en el lloc corresponent a un determinat codó.

Avantatges i inconvenients dels mètodes genotípics

Els grans avantatges dels mètodes genotípics (Taula 4) són la seva relativa senzillesa i rapidesa en comparació amb els mètodes fenotípics i que estiguin disponibles o a l'abast de molts laboratoris de microbiologia clínica. Donada la seva major sensibilitat, els mètodes genotípics podrien detectar la presència de mutacions causants de resistència abans que el fenotip de l'HIV-1 canviï i es faci resistent. Dels mètodes genotípics, els

TAULA 3. Característiques dels mètodes genotípics.

Mètode	Mostra ^a (volum)	Càrrega viral necessària	Seqüència analitzada ^b (codons)	Components del sistema ^d	Genotip per assaig	Temps de realització
Sequenciació HIV-1	Plasma EDTA (1 ml) Poden usar-se: CMSP, LCR, teixit limfoide	1000 còpies/ml	PT (1-99) RT (1-320)	Reactius Seqüenciador Software (MacIntosh o PC)	6-16	2-3 dies
TruGene HIV-1 Genotyping Assay (Visible Genetics, Inc.)	Plasma EDTA (1 ml) Poden usar-se: CMSP, LCR, teixit limfoide	1000 còpies/ml	PT (1-99) RT (1-240)	Reactius Seqüenciador Sistema operatiu UNIX	1,6	1 dia
VircoGEN (Virco)	Plasma EDTA (2 ml)	1000 còpies/ml	<i>Gag-pol cleavage region (p7/p1, p1/p6) PT (1-99) RT (1-400)</i>			2-3 setmanes (des de la tramesa de la mostra)
Detecció de mutacions puntuals LiPA (Innogenetics)	Plasma EDTA (1 ml)	1000 còpies/ml	RT (41-215) ^c PT (30-90) ^c	Reactius Material auxiliar ^e	1-30	2 dies

^aLa mostra ha d'obtenir-se mentre el pacient estigui rebent el tractament antiretroviral que està fracassant. CMSP significa cèl·lules mononucleades de sang perifèrica.

^bRT indica transcriptasa inversa; PT indica proteasa. ^cNomés es detecten mutacions seleccionades. ^dA més dels components de cada sistema, fa falta equip de PCR.

^eExisteix un sistema automatitzat (Auto-LiPA) per du a terme el procés d'hibridació.

TAULA 4. Principals avantatges i desavantatges dels mètodes genotípics.

Mètode	Avantatges	Desavantatges
Seqüenciació	<ul style="list-style-type: none"> • Disponible en molts laboratoris. • Relativa rapidesa. • Proporciona informació completa sobre la seqüència de la regió analitzada. • Pot detectar resistències abans que el fenotip es faci resistent. • Permet identificar mutacions causants de resistències a nous fàrmacs. • Permet caracteritzar patrons mutacionals en el context del tractament antiretroviral combinat. 	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil obtenir resultats si la mostra té nivells baixos d'RNA viral. • Difícil interpretació de genotips complexos; no proporciona informació sobre interaccions entre mutacions o sobre resistències creuades. • No detecta subpoblacions virals que constitueixin <20% de la població total. • Limitada informació sobre la correlació entre genotip i fenotip, poden existir discrepàncies.
Hibridació amb sondes específiques	<ul style="list-style-type: none"> • Senzillesa i ràpidesa. • Accessible a molts laboratoris. • Pot detectar subpoblacions virals que constitueixen el 5%-10% de la població total. 	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil obtenir resultats si la mostra té nivells baixos d'RNA viral. • Possibilitat de falsos negatius quan la seqüència viral presenta polimorfismes en codons adjacents. • Informació limitada sobre el genotip viral, ja que detecta únicament mutacions concretes causants de la resistència de l'HIV-1. • No proporciona informació sobre interaccions entre mutacions o sobre resistències creuades. • Limitada informació sobre la correlació entre genotip i fenotip, poden existir discrepàncies.

que es basen en tècniques de seqüenciació proporcionen informació completa de la seqüència de la regió del genoma de l'HIV-1 que s'estigui analitzant, permeten identificar noves mutacions causants de la resistència a un determinat fàrmac i faciliten la caracterització dels diversos patrons mutacionals pels que l'HIV-1 adquireix resistència als diferents anti-retrovirals en el context del tractament combinat. Tanmateix, els mètodes de seqüenciació poden no detectar variants de l'HIV-1 quan aquestes constitueixin menys del 20% de la població viral total. Possiblement, això passi com a conseqüència de la selecció de la població predominant de l'HIV-1 durant la fase d'amplificació de les seqüències virals mitjançant PCR.

Un desavantatge important comú a tots els mètodes genotípics és la dificultat d'amplificar seqüències de l'HIV-1 a partir del plasma quan els nivells de càrrega viral són baixos (<1000 còpies/ml de plasma). Encara que la modificació de les condicions de processament de les mostres de plasma permet realitzar estudis genotípics en mostres de plasma amb nivells molt baixos de càrrega viral, el percentatge d'èxit en aquesta situació és variable.

L'inconvenient més gran dels mètodes de seqüenciació és la dificultat de la seva interpretació. Els resultats dels mètodes genotípics consisteixen en una llista de les mutacions trobades en la transcriptasa inversa i proteasa de l'HIV-1, agrupades en diferents categories:

- 1) Mutacions conegudes causants de resistència.
- 2) Mutacions en els mateixos codons que les mutacions que confereixen resistència, però amb un canvi d'aminoàcid diferent del que se'n desconeix l'efecte que pugui tenir sobre la resistència.
- 3) Mutacions en altres posicions diferents a les causants de resistència.

Interpretar aquests resultats és difícil a causa del gran nombre de mutacions descrites, a la complexitat de determinats genotips (especialment els que es troben en pacients que han rebut tractament amb molts antiretrovirals), a les possibles interaccions entre les diferents mutacions (efecte modulador, resistències creuades, hipersensibilitat) i al fet que els mètodes genotípics no proporcionen informació de l'efecte combinat de

les mutacions sobre la sensibilitat d'un determinat virus als diferents anti-retrovirals ni sobre la seva aptitud biològica ("*fitness*").

La presència d'una mutació concreta no sempre implica que el virus sigui resistent a un determinat fàrmac. Per exemple, la presència d'una única mutació en el codó 103 de la transcriptasa inversa de l'HIV causa una elevada resistència creuada a tots els inhibidors d'aquest enzim viral no anàlegs als nucleòsids. Tanmateix, perquè l'HIV desenvolupi resistència creuada als inhibidors de la proteasa fa falta que s'acumulin més de dues mutacions claus (D30N; G48V; I50V; V82A/F/T/S; I84V; L90M) en la proteasa viral. A més, la presència de polimorfismes o de mutacions en codons diferents als directament implicats en la producció de la resistència a un determinat antiretroviral poden modular (i a vegades revertir) el grau de resistència fenotípica del virus als fàrmacs d'un mateix grup. Un bon exemple d'aquest tipus d'interacció el constitueix l'efecte de la mutació M184V (causant de la resistència de l'HIV-1 a la lamivudina) en la reversió de la resistència de l'HIV-1 a la zidovudina. Atès el gran nombre de mutacions causants de resistència als antiretrovirals descrites en la transcriptasa inversa i en la proteasa de l'HIV-1, s'ha de suposar que existeixen altres interaccions que modulen l'efecte de determinats genotips sobre el fenotip viral.

L'avantatge del LiPA sobre els mètodes de seqüenciació és que és més senzill i ràpid i, a vegades, té major sensibilitat per a la detecció de poblacions mutants minoritàries quan aquests suposen el 5% a 10% de la població total. Tanmateix, la major limitació del LiPA és que aporta informació sobre la presència o no de mutacions causants de resistència als antiretrovirals únicament en determinats codons de la transcriptasa inversa i de la proteasa de l'HIV-1.

La informació de què disposem actualment comparant els diferents mètodes genotípics és molt limitada. Estudis en què s'ha comparat el mètode de LiPA amb els de seqüenciació suggereixen que en alguns casos el primer és més sensible per a la detecció de poblacions minoritàries i que el grau de concordança que s'obté amb ambdós mètodes oscil·la entre el 73% i el 98%.

Encara que el principi dels mètodes genotípics descrits és el mateix (amplificació de seqüències virals mitjançant PCR seguida de l'anàlisi complet o restringit de les seqüències virals amplificades), existeixen diferències importants entre ells en el procés d'extracció de l'RNA a partir de la mostra, en els *primers*, en les condicions de la PCR i en les regions de la transcriptasa inversa i de la proteasa viral analitzades (Taula 3). A més, la química de les reaccions de seqüenciació i els programes d'ordinador utilitzats pels diferents mètodes de seqüenciació per analitzar els resultats són també diferents. Per tant, és possible que l'anàlisi d'una mateixa mostra mitjançant mètodes genotípics diferents produeixi resultats discrepants.

Mètodes fenotípics

Els mètodes fenotípics defineixen la concentració del fàrmac que inhibeix el creixement en cultiu d'una determinada soca viral. El resultat s'expressa com la concentració de fàrmac que redueix en un 50% (CI_{50}) o en un 90% (CI_{90}) el creixement del virus en cultiu. Els primers mètodes fenotípics van utilitzar línies cel·lulars (Hela-CD4, MT2, MT4, ATH-8, etc.) o cèl·lules mononucleades de sang perifèrica. Aquests mètodes estaven limitats per la seva complexitat, laboriositat, elevat cost i falta d'estandarització.

Actualment existeixen, en laboratoris comercials, mètodes fenotípics semiautomatitzats basats en la utilització de virus recombinants (assaig de virus recombinant) que permeten determinar la sensibilitat de l'HIV-1 a tots els antiretrovirals disponibles de forma eficaç i relativament ràpida. Els dos mètodes fenotípics comercials són *Phenosense* (ViroLogic, Califòrnia) i *Antivirogram* (Virco, Bèlgica) (Taula 5). Ambdós mètodes amplifiquen mitjançant PCR la transcriptasa inversa i la proteasa de l'HIV-1 (fragment PT-RT) directament a partir de mostres de plasma. El mètode *Phenosense* utilitza tècniques de clonatge per introduir el fragment PT-RT en el genoma d'una partícula de l'HIV-1 en què el gen *env* ha estat substituït per un gen productor de luciferasa. La CI_{50} del virus recombinant es determina quantificant l'expressió del gen de la luciferasa en cul-

TAULA 5.
Característiques dels mètodes fenotípics.

Mètode (laboratori)	Mostra* (volum)	Càrrega viral necessària	Temps de realització	Definició de fenotip resistent	Informació inclosa en els resultats
Phenose (Virologic)	Plasma EDTA (3 ml)	500 còpies/ml	2-3 setmanes (des de la tramesa de la mostra)	$CI_{50} \geq 2,5$ vegades superior a la de la soca control NL4-3	CI_{50} del virus del pacient per a cada fàrmac Relació entre la CI_{50} del virus del pacient i la CI_{50} de la soca control per a cada fàrmac
Antivirogram (Virco)	Plasma EDTA (2 ml)	1000 còpies/ml	2-3 setmanes (des de la tramesa de la mostra)	$CI_{50} > 4$ vegades superior a la de la soca control HXB-2	No es proporcionen valors de CI_{50} S'indica de forma gràfica per a cada fàrmac si el virus és sensible, resistent o la seva sensibilitat és intermèdia

*La mostra ha d'obtenir-se mentre el pacient estigui rebent el tractament antiretroviral que està fracassant.

tius de cèl·lules infectades amb el virus recombinant en presència d'anti-retrovirals.

En el mètode *Antivirogram* els virus recombinants es preparen mitjançant transfecció de cèl·lules MT-4 amb el producte PT-RT (amplificat a partir del plasma del pacient mitjançant PCR) i amb un plàsmid que conté el genoma complet de l'HIV-1 (a excepció de la regió PT-RT). La CI_{50} del virus recombinant es determina de forma automatitzada en cultius, mesurant la viabilitat de cèl·lules MT4 infectades amb el virus recombinant en presència d'antiretrovirals.

Avantatges i inconvenients dels mètodes fenotípics

La major avantatge dels mètodes fenotípics (Taula 6) és que proporcionen una mesura directa de sensibilitat de l'HIV-1 als diferents fàrmacs antiretrovirals. Com que el resultat obtingut (CI_{50} o CI_{90}) representa l'efecte combinat sobre la sensibilitat de l'HIV-1 de les mutacions presents

TAULA 6.
Principals avantatges i desavantatges dels mètodes fenotípics.

Avantatges	Desavantatges
<ul style="list-style-type: none">• Proporcionen una mesura directa de la sensibilitat de l'HIV als diferents antiretrovirals.• Fàcil interpretació.• Proporcionen informació sobre les resistències creuades.• Existència de bases de dades àmplies que permeten obtenir un fenotip "virtual" a partir del genotip viral.	<ul style="list-style-type: none">• Dificil obtenir resultats si la mostra té nivells baixos d'RNA viral.• No detecten subpoblacions virals que constitueixin <10%-50% de la població total.• Proporcionen informació sobre la sensibilitat de l'HIV a fàrmacs individuals i no sobre la sensibilitat del virus a combinacions d'antiretrovirals.• Els valors de CI_{50} (o CI_{90}) que defineixen sensibilitat o resistència no estan ben definits per a cada fàrmac.• Limitada informació sobre la correlació entre genotip i fenotip, poden existir discrepàncies.• Disponible únicament en laboratoris comercials.• Elevat cost.• Demora en l'obtenció de resultats.

en el seu genoma, els mètodes fenotípics disminueixen els problemes d'interpretació dels resultats dels mètodes genotípics. Altres avantatges importants dels mètodes fenotípics són que proporcionen informació sobre l'existència de resistències creuades i que poden adaptar-se amb facilitat per determinar la sensibilitat de l'HIV-1 als nous fàrmacs antiretrovirals.

Els mètodes fenotípics disponibles actualment tenen desavantatges importats. Com que es basen en l'amplificació de seqüències virals a partir del plasma, obtenir un fenotip pot no ser possible si els nivells de virèmia plasmàtica són baixos. Igual que el mètodes genotípics, els mètodes fenotípics no detecten variants minoritàries de l'HIV-1 quan aquestes constitueixen <10% al 50% de la població viral total. Això és causa de la selecció de la població predominant de l'HIV-1 durant l'amplificació de seqüències virals a partir del plasma mitjançant PCR. Per tant, els mètodes fenotípics poden no detectar la presència d'HIV-1 resistent quan aquest representa una població viral minoritària. Un altre desavantatge dels mètodes fenotípics és que proporcionen informació sobre la sensibilitat d'un determinat virus a cada un dels antiretrovirals de forma individual, però no aporten informació sobre la sensibilitat del virus enfront de combinacions de fàrmacs. L'altre inconvenient important és que els valors de CI_{50} (o CI_{90}) que defineixen resistència per a cada un dels fàrmacs antiretrovirals no estan ben establertes. Finalment, la disponibilitat dels mètodes fenotípics és restringida, essent limitada en l'actualitat a laboratoris comercials, i el seu cost és elevat.

Correlació entre els mètodes genotípics i fenotípics

Els estudis publicats fins avui en què es compara el fenotip i el genotip de l'HIV-1 en la mateixa mostra clínica són escassos, però indiquen que aquesta correlació no és perfecta. En aquests estudis, el grau de discrepància entre el fenotip viral (obtingut mitjançant assajos de virus recombinants) i el genotip (obtingut mitjançant seqüenciació) oscil·la entre un 15% i un 26%. En general, es tracta d'HIV-1 la resistència fenotípica del qual és moderada (CI_{50} entre 2,5 i 10 vegades superior a la del virus con-

trol) i no conté en el seu genotip cap de les mutacions primàries causants de resistència als antiretrovirals. Amb freqüència, aquests virus el fenotip i genotip dels quals és discordant contenen en el seu genoma polimorfismes en la seqüència de la transcriptasa inversa i de la proteasa. L'efecte que aquests polimorfismes pugui tenir sobre el fenotip de l'HIV-1 no està ben establert.

L'existència en els laboratoris Virco d'una àmplia base de dades que té informació fenotípica i genotípica sobre més de 50.000 mostres ha donat lloc al concepte de fenotip "virtual" (*VircoGEN II*). Una vegada s'ha obtingut el genotip viral, s'interroga la base de dades per tal d'identificar la sensibilitat als diferents antiretrovirals que corresponen en aquest genotip. El gran avantatge del fenotip virtual és que proporciona informació ràpida sobre la sensibilitat de l'HIV-1 una vegada conegut el seu genotip, sense que sigui absolutament necessari fer un test fenotípic. Tanmateix, el fenotip virtual té dos desavantatges importants: el primer és que la base de dades no inclou tots els possibles genotips, especialment els seleccionats per noves combinacions de fàrmacs o nous antiretrovirals; el segon és que l'accés en aquesta base de dades és limitat.

Control de qualitat

En el moment actual, els mètodes virològics, i molt especialment, l'anàlisi de resistències de l'HIV-1, es duen a terme en laboratoris d'investigació, en laboratoris assistencials i en laboratoris comercials, sense que s'hagi establert de forma sistemàtica un procés d'estandardització dels diferents mètodes ni un programa de control de qualitat universal. Com s'ha assenyalat anteriorment, els mètodes genotípics requereixen en primer lloc la utilització de la PCR per amplificar seqüències de l'HIV-1 a partir de mostres clíniques. Per tant, és fonamental que en els laboratoris on es realitzen aquest tipus d'estudis es segueixin procediments estrictes per evitar problemes de contaminació quan s'utilitzen tècniques de PCR. També pot haver-hi contaminació durant la preparació dels productes amplificats per a la seqüenciació i en altres manipulacions tècniques. En

conseqüència, la realització escrupolosa dels procediments tècnics i l'adopció de mesures generals de bona pràctica en el laboratori són factors clau per a l'obtenció de resultats fiables. Addicionalment, és molt aconsellable introduir procediments concrets de control de qualitat intern i extern. Per exemple, és important comparar periòdicament mitjançant anàlisi filogenètica les seqüències que es generen en un mateix laboratori. En general, ha de sospitar-se contaminació quan existeix una divergència significativa entre seqüències procedents d'un mateix pacient o bé quan no existeix suficient divergència entre les seqüències procedents de diferents pacients o entre les seqüències obtingudes a partir de mostres clíniques i les de la soca de l'HIV utilitzada com a control.

La necessitat d'instaurar urgentment programes de control de qualitat ha quedat ben establerta en dos estudis multicèntrics internacionals que han demostrat diferències i deficiències importants en la qualitat dels resultats obtinguts per laboratoris amb experiència en la realització de mètodes genotípics. En el primer estudi, 23 laboratoris van analitzar un plafó (ENVA-1) que incloïa barreges en diferents proporcions d'HIV sense mutacions i d'HIV amb mutacions en la transcriptasa inversa. En aquest estudi va haver-hi laboratoris que van informar de la presència de mutacions associades a resistència en mostres sense cap mutació, així com laboratoris que no van detectar la presència de mutacions en mostres en què el 100% de la població viral era mutant. Els resultats d'un estudi subsegüent en què es va analitzar el genotip d'un plafó viral (ENVA-2) amb barreges d'HIV amb i sense mutacions en la transcriptasa inversa i en la proteasa van posar novament de manifest l'existència de deficiències importants en la qualitat dels resultats obtinguts. Menys de la meitat dels 56 laboratoris participants van obtenir seqüències correctes quan van analitzar mostres constituïdes per una barreja en proporcions iguals d'HIV sense mutacions i d'HIV amb mutacions causants de resistència a anti-retrovirals.

Actualment, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) conjuntament amb l'Instituto de Salud Carlos III han desenvolupat un programa control de qualitat de la càrrega

viral i en un futur pròxim estarà disponible el programa control de qualitat sobre el genotipat de l'HIV-1 (www.seimc.es).

CONCLUSIONS

Els ràpids i constants canvis que s'estan produint tant en el maneig clínic dels pacients com en el desenvolupament tecnològic necessari per aquest maneig, constitueixen un repte per al clínic, el microbiòleg i l'immunòleg, obligant freqüentment a la utilització conjunta tant de coneixements com de tecnologies ja establertes en les rutines assistencials amb aquells altres derivats de la pròpia investigació a través dels assajos clínics.

Finalment, és important destacar que en la majoria dels casos s'ha assumit l'important increment pressupostari derivat d'aquestes noves tecnologies, però a canvi la dotació en personal i espais no només no s'ha incrementat, sinó que moltes vegades s'ha vist disminuïda. No oblidem que si bé el tractament antiretroviral té un cost molt elevat, les actuals teràpies d'elevada eficàcia han aconseguit reduir extraordinàriament els costos derivats de l'hospitalització i del tractament de les infeccions oportunistes, però això exigeix la perfecta optimització de la teràpia antiretroviral a través del monitoratge virològic i immunològic dels pacients.

ADRECES D'INTERÈS A INTERNET

- <http://www.hivresistance.com>
- <http://www.hiv.lanl.gov>