



Comité de Formación Continua
Asociación Española de Biopatología Médica

PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH

**CURSO DE FORMACIÓN CONTINUADA A
DISTANCIA 2011-2012**

**ACTUALIZACIONES EN EL
LABORATORIO CLÍNICO
Nº 6**

I.S.S.N.- 1988-7477

Título: Actualizaciones en el Laboratorio Clínico

Editor: Asociación Española de Biopatología Médica

Maquetación: AEBM

Fecha de Distribución: Abril de 2012

Copyright 2001

La A.E.B.M. se reserva todos los derechos . Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo las fotocopias, grabaciones o cualquier sistema de recuperación de almacenaje de información sin la autorización por escrito de la A.E.B.M.

Procedimientos de biología molecular para el estudio de la infección por el VIH

***Ángel San Miguel-Hernández.- Servicio de Análisis
Clínicos Hospital Universitario Río Hortega. Valladolid.***

INTRODUCCIÓN

La virología comienza a adquirir relevancia en la década de los 70, con el descubrimiento del virus de la hepatitis B, primer virus identificado como contaminante potencial de la sangre. El cambio más importante en este campo surgió en los años 80 con el descubrimiento de tres aspectos. El primero fue la identificación de un retrovirus causante de la leucemia de las células T o HTLV I. Posteriormente, se descubrió la relación entre el virus de Epstein-Barr y algunos virus ADN del grupo del herpes, con algunos tumores como el Linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo. Más tarde, el virus del papiloma humano, otro virus ADN, fue asociado significativamente con el cáncer de cerviz (1-3).

En 1981 aparecieron los primeros estudios sobre el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y en 1983 se observó que el agente causal de esta enfermedad era un nuevo virus del grupo de los retrovirus. El diagnóstico definitivo de la infección por el VIH sólo puede establecerse por métodos de laboratorio, ya que en ningún caso las manifestaciones clínicas son lo suficientemente específicas (3-5).

Los métodos indirectos permiten la detección de anticuerpos específicos anti-VIH siendo la forma habitual de diagnosticar una infección por VIH y se dividen en pruebas de screening y pruebas confirmatorias, caracterizadas por su especificidad y que permiten asegurar la positividad de una muestra previamente reactiva con un test de screening.

Las pruebas de screening están diseñadas con un máximo de sensibilidad para detectar todas las muestras positivas. Las técnicas inmunoenzimáticas (EIA) son las más empleadas debido a su metodología relativamente simple, alta sensibilidad, nivel de automatización y diseño para realizar un gran número de tests de forma simultánea.

Otras pruebas de screening caracterizadas por la obtención de resultados en menos de 30 minutos, son muy útiles aplicadas en situaciones que requieren un resultado inmediato, como trasplantes, accidentes laborales o antes del parto en una embarazada que no ha sido controlada con respecto a la infección por el VIH. Entre ellas se incluyen las pruebas "dot blot" y las inmunocromatográficas (3,5,6).

Las pruebas de confirmación permiten asegurar la positividad de una muestra en la prueba de screening. Como test confirmatorios se emplean el *Western blot* (WB), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) o la radioinmunoprecipitación (RIPA) (3, 7).

Los métodos directos están basados en la detección del virus o alguno de sus componentes. Incluyen el cultivo vírico, la determinación de antígeno p24 en plasma o suero y la demostración de genoma vírico mediante técnicas moleculares (8-11).

Aunque el cultivo celular es la técnica más específica para el diagnóstico de la infección, su utilización suele reservarse para estudios básicos de variabilidad genética, epidemiología molecular, patogénesis vírica o resistencia a fármacos, debido a la complejidad y riesgo que supone su realización (12).

El antígeno p24 de la cápside del VIH (core), detectado en suero o plasma mediante una reacción de EIA, es un marcador precoz de infección aguda por VIH. A lo largo de la infección su detección es variable debido al incremento de anticuerpos anti-p24 neutralizantes o a la escasa replicación del virus. Las técnicas que rompen los inmunocomplejos formados por el antígeno p24 y su anticuerpo aumentan la sensibilidad de la determinación y han sido propuestas para monitorizar el tratamiento antirretroviral en países en desarrollo (13).

La tecnología de los ácidos nucleicos abrió la principal vía de comprensión de muchos aspectos fundamentales de la infección por el VIH. Primero se observó que el VIH se produce durante todas las fases de la infección, incluso durante el periodo de latencia clínica. Además se pudo comprobar que el nivel de producción del VIH está relacionado con la progresión de la enfermedad. Más recientemente se supo que los niveles de producción del virus se mantienen por el importante *turnover* diario, al menos en las primeras fases de la enfermedad (14).

El desarrollo de estas técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos, ha sido capaz de detectar de forma específica el VIH a partir de secuencias irrelevantes. Estas técnicas se han empleado en el diagnóstico cuando los test serológicos fueron equívocos, en casos de sospecha de transmisión de la madre al hijo cuando la madre presenta anticuerpos frente al VIH, así como en estudios de variación genómica y para monitorizar la terapia antiretroviral.

La más conocida de todas las técnicas de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), altamente sensible. Así mismo, se han desarrollado otras técnicas de amplificación entre las que destaca la prueba del DNA ramificado (bDNA) y la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), de gran interés en la amplificación de secuencias de ARN (15-25).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se trata de la técnica de amplificación más conocida y en principio sólo fue aplicada al ADN, pero no al ARN. Esta envuelve dos cebadores de oligonucleótidos que flanquean el fragmento de ADN que va a ser amplificado, ciclos repetidos de desnaturalización del ADN por calor, anillamiento de los cebadores a las secuencias complementarias y extensión de los mismos con una ADN polimerasa (Fig. 1). La Taq polimerasa (aislada del *Thermus aquaticus*) permite que la reacción se pueda realizar a temperaturas elevadas.

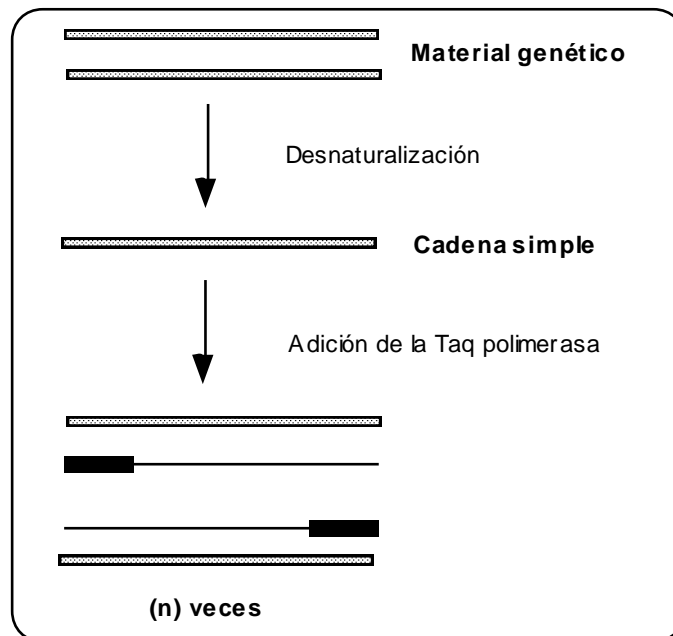


Fig. 1. Diferentes etapas de la PCR

La prueba de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se lleva a cabo por una misma enzima recombinante, que copia el ARN en ADNc, y luego amplifica el número de copias. El material de partida es ARN plasmático al que se añade un control interno de cuantificación. Gracias a este control interno se resuelven los problemas que previamente hubieran ocurrido en las etapas de aislamiento y amplificación. Sobre esta mezcla se realiza una reacción de retrotranscripción (RT) y, a continuación, la amplificación mediante PCR, utilizando el control y la muestra problema. El producto final se detecta mediante métodos de quimioluminiscencia (12). La detección se realiza en una microplaca, y los pocillos se ocupan con diluciones seriadas del producto de la amplificación. Una vez finalizada la hibridación se revela al añadir un substrato. La placa se lee a una longitud de onda determinada, y con los resultados de la lectura, basándonos en los datos obtenidos para el control interno, obtenemos el número de copias de ARN viral presente en la muestra problema (16).

La amplificación por PCR del ARN requiere que este primero sea convertido en el ADN complementario utilizando una transcriptasa. Este procedimiento sólo se pudo realizar gracias al descubrimiento del Tth, una enzima que posee actividad de polimerasa y de transcriptasa inversa. A pesar de todo, esta técnica requiere instrumentación y una manipulación de la muestra en condiciones especiales, por lo que una serie de técnicas alternativas están siendo motivo de estudio (27).

PRUEBA DEL ADN RAMIFICADO (bDNA)

La prueba del ADN ramificado (branched DNA, bADN) se basa en la amplificación de una señal que se liga al ARN viral. Se lleva a cabo a partir de la extracción del ácido nucleico presente en las partículas virales previamente aisladas mediante ultracentrifugación, reflejando un valor más aproximado del número de viriones realmente circulantes. El material de partida son los viriones y no el ARN plasmático total, como ocurre con otras técnicas, y es a partir de éstos de donde se extrae el ARN viral, evitando aislar material genético no encapsulado. El aislamiento y todo el proceso ulterior se realiza por duplicado para cada muestra. Este control de calidad es requerido porque no se utilizan controles internos para cada muestra, sino para el total de muestras analizadas.

Una cadena simple de ADN o ARN se hibrida a un surtido de sondas de hibridación que contienen, además de una secuencia específica del VIH-1, una secuencia complementaria a cada sonda o a cada molécula de ADN. La sonda de ARN complementario es capturada en una fase sólida, seguido de la hibridación de las moléculas de ADN amplificadas que median en la señal de amplificación. Las sondas que llevan unido enzimas se unen entonces a las moléculas de ADN, y la detección se basa en la adición del correspondiente sustrato. Esta técnica demanda un volumen de muestra elevado y un enriquecimiento de las moléculas de ARN genómico mediante la producción de un *pellet* para obtener una sensibilidad suficiente (2) (Fig. 2).

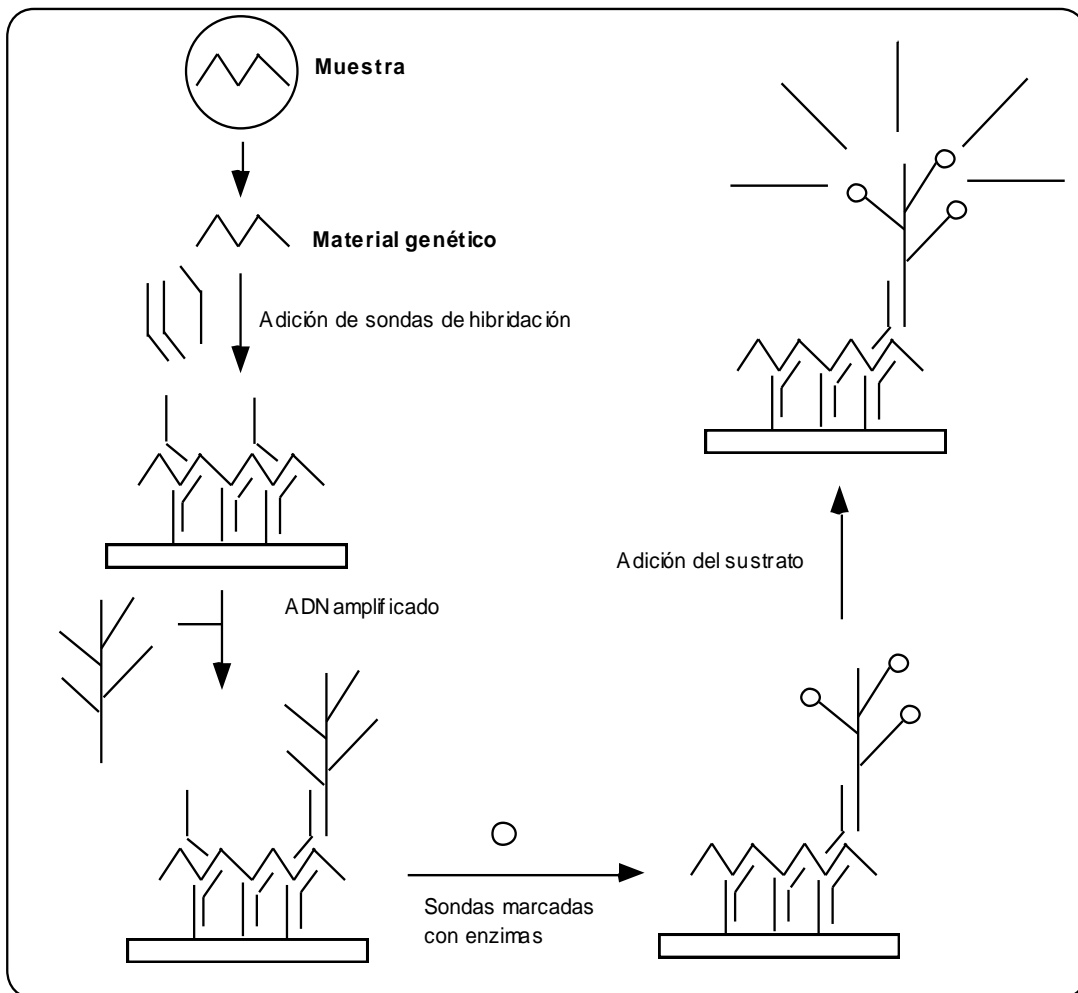


Fig. 2. Etapas de la técnica bDNA

La prueba de bADN de 1ª generación presentaba el inconveniente de su menor sensibilidad respecto a las anteriores (del orden de 10⁴ copias/mL), en la actualidad se dispone de nuevos métodos ultrasensitivos, que permiten alcanzar umbrales parecidos a los que se obtienen con los métodos que amplifican la molécula diana.

A partir de los resultados obtenidos en la lectura de la placa y tomando como referencia la lectura de los pocillos control (que tienen un número conocido de copias)

puede determinarse la carga viral presente en la muestra. Al disponer de resultados por duplicado para cada una de las muestras, si el coeficiente de variación supera el 30%, la medición se considera nula y debe repetirse.

AMPLIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS (NASBA)

1. Etapas de la técnica NASBA

Hay cuatro aspectos cruciales a tener en cuenta para la realización de la técnica NASBA:

- Calidad del ensayo: debe incluir una extracción y preparación adecuada de la muestra
- Calidad del método de amplificación
- Uso de estándares internos semejantes al producto amplificado de la muestra
- Técnica de detección (13, 20, 26) (Fig. 3).

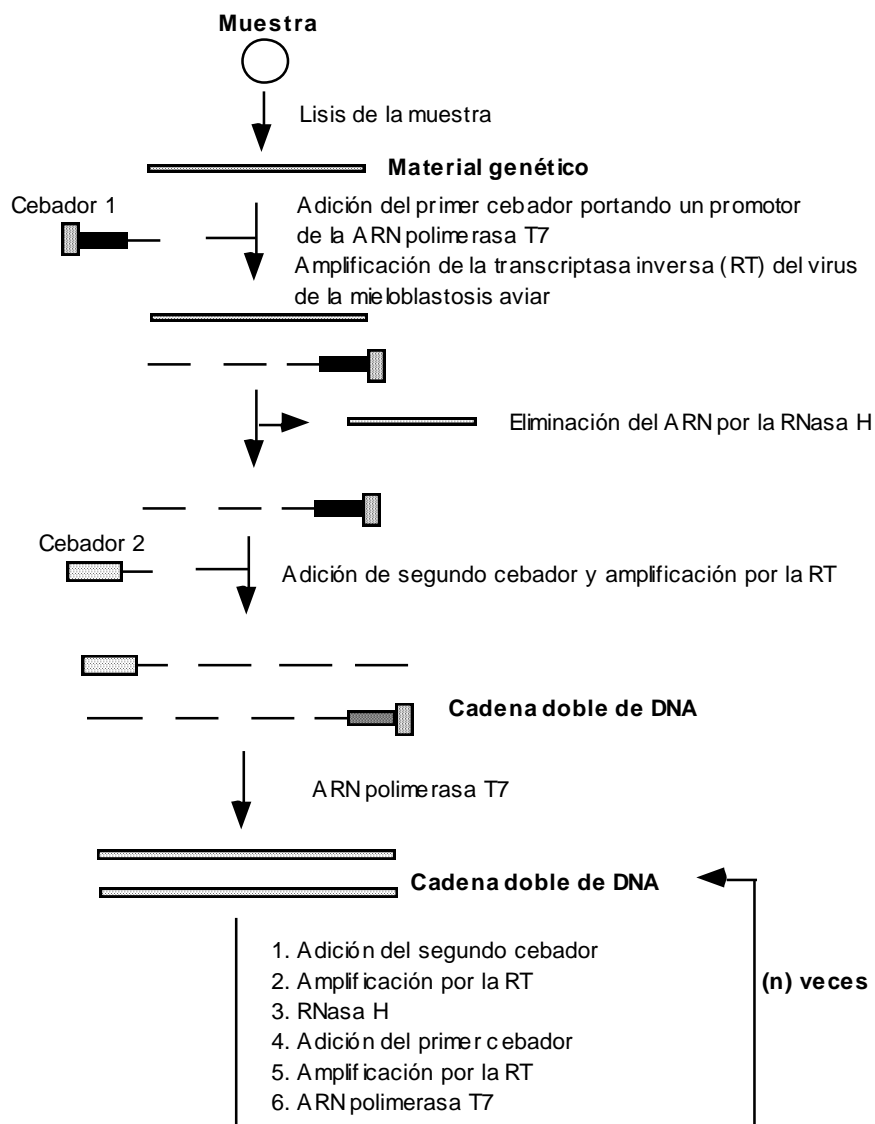


Fig. 3. Diferentes etapas de la técnica NASBA.

1.1 Extracción del ARN

La extracción y purificación del ácido nucleico se considera generalmente laboriosa y consume mucho tiempo. El método desarrollado por la Academic Medical Center es simple, fiable y de elevada producción.

La unión de los ácidos nucleicos a sílice o partículas de cristal en presencia de agentes criotrópicos es de sobra conocida, pero nunca con anterioridad había sido aplicada a muestras clínicas. Se trata de un método nuevo que utiliza los agentes criotrópicos tiocianato de guanidina o hidrocloreuro de guanidina.

La técnica de extracción de ácidos nucleicos es muy sensible, rápida y simple, minimizando el contacto con otros patógenos. El ARN es recuperado en una forma no degradada y la recuperación parece ser muy eficiente, en el rango del 70-90%.

1.2 Amplificación

El método NASBA amplifica el ácido nucleico bajo condiciones isotérmicas (en contraposición a la PCR) por el uso de tres enzimas simultáneas: transcriptasa inversa, RNasa H y una ARN polimerasa dependiente de ADN. Esta estrategia imita el ciclo de vida retroviral, produciendo ARN a partir del ADN.

A la muestra problema se añaden tres calibradores internos (QA, QB y QC) presentes en una concentración relativa de 100:10:1, que sólo se diferencian entre sí y respecto al ARN amplificado del VIH en 20 nucleótidos, que son los implicados en la detección. La reacción comienza con la hibridación de uno de los cebadores de oligonucleótidos (el que contiene el promotor T7) a la plantilla de ARN, seguida de la elongación del cebador por la transcriptasa inversa.

La particularidad de esta técnica es que uno de los oligonucleótidos sintéticos iniciadores de la amplificación contiene la zona promotora necesaria para que actúe una enzima capaz de sintetizar ARN a partir del ADNc, denominada ARN polimerasa T7 (ARN polimerasa-ADN dependiente). La cadena de ARN resultante de la molécula hibridada ADN-ARN es entonces degradada por la RNasa H, la cual es capaz de anillar el segundo cebador de oligonucleótidos a la cadena de ADNc. A continuación, una segunda cadena de ADN es sintetizada por la ARN polimerasa dependiente de ADN, conduciendo a una molécula de ADN de doble cadena con una secuencia T7 ARN polimerasa.

La T7 ARN polimerasa puede producir entre 100-1000 copias de ARN de cada molécula de ADN. Cada molécula ARN sintetizada puede servir como molde para la síntesis subsiguiente de ARN.

La técnica NASBA permite una buena amplificación de ARN, con modificaciones también puede amplificar ADN. Requiere poca instrumentación y manipulación, por lo que es la técnica idónea para el estudio de virus con genoma ARN como el VHC o el VIH.

1.3 Cuantificación

Experimentos de modulación por ordenador han mostrado que los ensayos cuantitativos basados en la coamplificación de estándares externos son mejores que otros métodos. Una secuencia presente en la muestra puede ser utilizada como estándar permitiendo la valoración de la cantidad de secuencia blanco con relación a la secuencia celular y el control de la eficiencia de extracción para cada muestra. La principal desventaja es que la eficiencia de amplificación puede variar sustancialmente del ARN viral libre y el asociado a la célula. Este método puede ser suficiente para la

cuantificación del ADN, pero no es óptima para la cuantificación del ARN. Esta influenciada de forma crítica por la variación del número de moléculas de estándar.

En un principio, la cuantificación de la amplificación de los ácidos nucleicos usaba concentraciones diluidas de estándares externos, debido a la variación en la eficiencia de la amplificación, ha sido necesario mejorar el método con la introducción de estándares internos.

En caso de amplificación del ARN, se prefiere la adicción de un estándar. Cuando se añaden estándares ARN la cuantificación más acertada ocurre cuando la secuencia blanco es amplificada con el mismo cebador y con la misma eficiencia. Para la cuantificación del número de moléculas blanco, estas se deben diferenciar de los estándares añadidos.

La adicción de un estándar se realiza por uno de estos tres métodos:

- introducción de un lugar único de restricción en la molécula estándar
- introducción de una inserción o deleción en la molécula estándar
- reemplazamiento de una parte del estándar por un tramo único de nucleótidos complementarios a la sonda específica de estándar.

La introducción de un lugar de restricción no afecta a la eficiencia de la amplificación y permite la diferenciación del blanco y estándar por la digestión de la enzima de restricción. Por otro lado, a grandes cantidades de producto amplificado, se pueden formar moléculas heteroduplex que no pueden ser digeridas por las enzimas de restricción. Este efecto conduce a una sobrestimación del pico inicial.

La introducción de inserciones o deleciones conduce a una buena diferenciación entre el blanco y el estándar, alterando la eficiencia de la amplificación dado que los fragmentos pequeños se amplifican de forma más eficiente que los largos.

Cuando dos muestras con secuencias similares son coamplificadas, la cadena amplificada puede hibridar con las otras y obstruir la amplificación, por lo menos en la PCR. Esta prueba se considera competitiva. Por otro lado, cuando el estándar interno y la secuencia blanco muestran las mismas regiones de unión, pero difieren en la región de intervención, no puede ocurrir hibridación entre las cadenas. En este caso se habla de amplificación no competitiva. Se sabe que los estándares deben ser añadidos a la muestra clínica antes de aislamiento de los ácidos nucleicos, para eludir el impacto de una pérdida de ácidos nucleicos durante la extracción.

La detección del producto amplificado requiere una técnica altamente sensible a pesar de no ser radioactiva. La radiactividad hace que el ensayo sea más sensible, pero se necesita un laboratorio más complejo, con personal altamente cualificado y altas medidas de seguridad.

Una técnica no-radiactiva con sensibilidad óptima es la electroquimioluminiscencia (ECL). Se basa en los niveles de ECL que emite la luz como resultado de las reacciones químicas que ocurren en la superficie de un electrodo. La señal puede ser cuantificada de forma fácil y es útil en la detección de los ácidos nucleicos amplificados. Para ello, este sistema implica la participación de un oligonucleotido que es específico para el producto de la reacción del NASBA y que está biotilado en su extremo 5'. La sonda es inmovilizada en la superficie de un soporte magnético con estreptavidina, mediante una interacción biotina-avidina. La detección se realiza por la unión a la sonda, en el extremo 5' terminal, de rutenio, que es capaz de generar la señal de electroquimioluminiscencia.

El método NASBA basado en la extracción guanidina-sílice, la amplificación NASBA, la cuantificación por estándares internos y la detección por electroquimioluminiscencia ofrece un conjunto de herramientas para la cuantificación del ARN viral. De esta forma, se cuantifica más del 80% de las muestras con independencia de la relación con el momento de la seroconversión. Se trata de un ensayo de elevada precisión y no parece interferirle los factores de coagulación y los componentes séricos. Las diferencias en el número de virus parecen ser indicativas y reflejar el estadio de la enfermedad o la intervención terapéutica.

Los estudios clínicos han mostrado que los niveles de ARN por NASBA por debajo de los niveles de detección son indicadores eficaces de la falta de progresión o que esta es muy lenta. Por otro lado, un número de copias de ARN viral de $> 10^{5,5}$ copias/mL predicen un ostensible deterioro inmunológico.

En el estado temprano de la infección (los tres primeros años siguientes a la seroconversión) los individuos que progresan pueden ser diferenciados de los que no por el ensayo NASBA. La distinción está apoyada por una positividad para el antígeno p24, que al igual que el número de células CD4+, actúan como factores independientes de predicción de la progresión (Fig. 4).

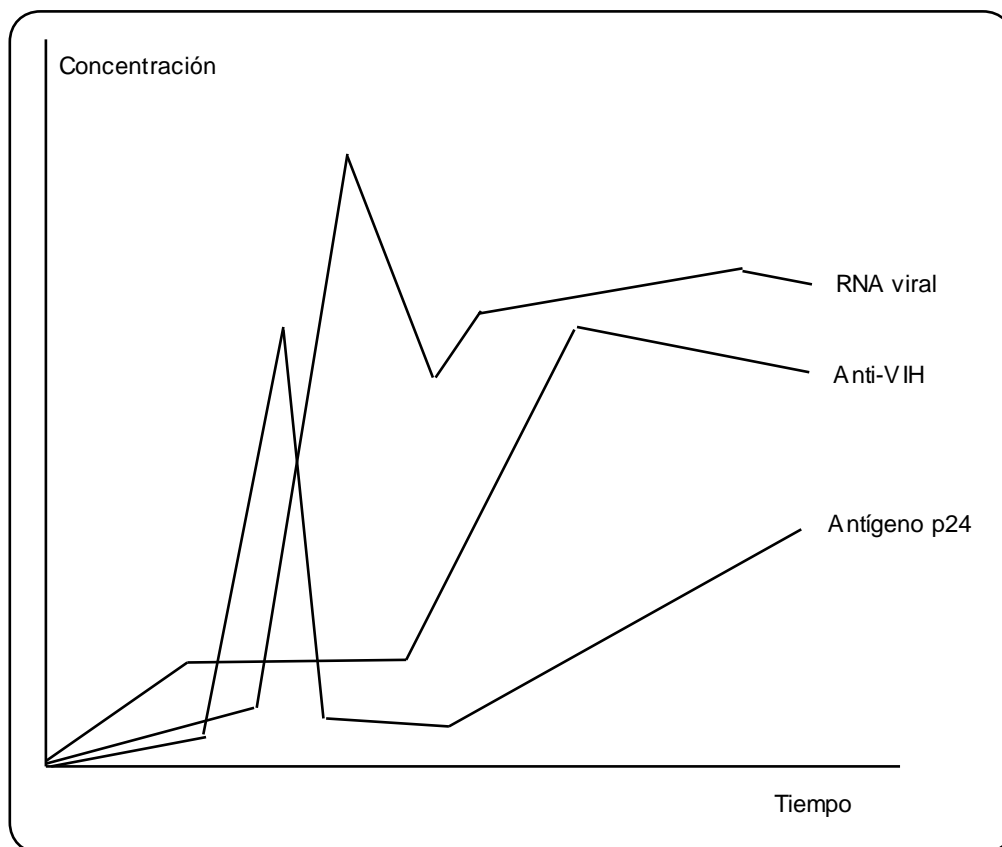


Fig. 4. Principales marcadores biológicos de la infección por el VIH.

Un agente retroviral efectivo debería disminuir la carga viral de forma significativa en las primeras dos semanas de tratamiento. Datos experimentales usando el ensayo NASBA como indicador apoyan este hecho. Estos aspectos fueron de gran importancia en el descubrimiento del tratamiento más efectivo y los protocolos de quimioprofilaxis.

La valoración de los ácidos nucleicos ha permitido contribuir al avance en el tratamiento del SIDA. La evaluación rápida del efecto del tratamiento en los niveles de ARN viral ha permitido la identificación del mejor régimen de tratamiento para posponer el desarrollo del SIDA. La cuantificación regular durante las primeras semanas de tratamiento da una buena idea de la respuesta del paciente. Dado que una respuesta rápida está fuertemente asociada con el beneficio clínico, la monitorización regular de la carga viral debería formar parte del seguimiento clínico de los sujetos afectados.

Por otro lado, somos capaces de cuantificar las partículas virales producidas, y por tanto, el número de células infectadas. Estos hallazgos pueden ser de gran importancia en el control del SIDA dado que reduciendo la carga viral no sólo disminuye la capacidad de progresión, sino al efectividad del virus contenido en los fluidos contaminantes (sangre, semen, etc.).

Principales diferencias entre las técnicas

- En cuanto a la instrumentación, además del material empleado de forma habitual en un laboratorio, el bADN sólo necesita un lector de placas; la RT-PCR, además de un lector de placas emplea un termociclador especial: el GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer); y el NASBA se vale de un instrumento semiautomático de detección por electroquimioluminiscencia. Tanto la prueba del bADN como la del NASBA incluyen un programa informático específico.
- Respecto a los volúmenes de muestra necesarios, la prueba de RT-PCR necesita 200 µL, la del NASBA 100 µL y la del bADN 1 mL por duplicado. La disponibilidad de muestra limitaba muchas veces la práctica de esta técnica.
- Respecto al tipo de muestra empleada por cada una de las pruebas, estas varían de forma considerable. En todos los casos se recomiendan muestras de plasma, aunque el NASBA se puede realizar directamente a partir de suero, sangre total, líquido cefalorraquídeo, semen y orina. La prueba de RT-PCR no puede realizarse a partir de plasma heparinizado, ya que por sus características quelantes, la heparina inhibe la PCR.
- El rango de detección varía de unos a otros. La prueba de 1ª generación del bADN presenta un umbral de detección de 10.000 copias por mL. Las pruebas de 2ª y 3ª generación del bADN pueden detectar hasta 500 y 25 copias por mL, respectivamente, y gozan de una excelente reproducibilidad. La prueba de RT-PCR presenta un límite de detección en torno a las 200-400 copias de ARN por mL y una desviación estándar menor de 0,35 logs. Una prueba de RT-PCR de 2ª generación permite detectar hasta 20 copias de ARN por mililitro de plasma. El NASBA permite detectar aproximadamente 4.000 copias de ARN del VIH.
- En cuanto al tiempo necesario para la obtención de resultados, en condiciones adecuadas, es de 24 horas para RT-PCR y NASBA, y de 48 horas para el bADN.
- Con referencia al rendimiento, se procesan 42 muestras con la técnica del bADN, 22 con la prueba de RT-PCR y 10 con la del NASBA.

2. Principales aspectos a valorar de la técnica NASBA

2.1 Precisión y exactitud

Se combina un método de extracción y la tecnología de amplificación NASBA en un solo tubo. Se utilizan estándares internos añadidos a la muestra antes de la extracción y para la cuantificación se utiliza una metodología de detección no-radioactiva altamente sensible. Se ha observado que la cuantificación exacta es posible entre un factor 10 por debajo de estándar interno bajo y un factor 10 por encima del estándar alto. Estándares de 10^4 , 10^5 y 10^6 permiten una cuantificación del orden de 10^3 - 10^7 copias por mL de suero o plasma. El rango dinámico del NASBA fue determinado usando diluciones en serie del VIH en plasma. La estandarización del número de copias virales esta basado en una partícula contenida en un stock viral con un título infeccioso de $1,2 (\pm 0,04)10^4$ unidades formadoras de sincitios. El tope de moléculas de ARN cuantificadas por el método NASBA fue de $5,5 (\pm 1,8)10^{10}$ para una densidad de partículas de $2,9 (\pm 1,6)10^{10}$, mostrando un elevado nivel de precisión, dado que cada partícula viral contiene dos moléculas de ARN (20).

Para calcular la precisión y la exactitud de un tubo de NASBA, tres concentraciones del stock viral estandarizado fueron añadidas usando 100 μ L de plasma y 900 μ L de buffer, y cada concentración fue cuantificada 20 veces. Se encontró que la precisión se incrementa a medida que lo hace la concentración de ARN viral.

Dado que las terapias más eficaces reducen la carga viral al menos 2 log durante las primeras semanas o meses, esta técnica presenta buenos valores de precisión y exactitud.

2.2 Relación entre la carga viral y el número de células cd4+.

La principal causa de progresión a SIDA es la inducción por el VIH de inmunodeficiencia caracterizada por anomalías funcionales y numéricas de las células T CD4+. La caída en número de las células CD4+ se trata del mejor parámetro de laboratorio en la indicación de la afectación del sistema inmune. Una caída por debajo de 200 células CD4+ por μ L está altamente asociada con un desarrollo eminente del SIDA (10, 25).

Resulta interesante que un grupo de pacientes que sufren una caída similar, no desarrollan el SIDA durante 1-2 años. Esto indica, que con independencia del número de células CD4+, este parámetro se muestra como un buen agente de predicción del estadio clínico durante el curso natural de la infección.

Se ha descrito una estrecha correlación entre la carga viral y la evolución más o menos rápida a SIDA en individuos VIH positivos, de manera independiente de la cifra de linfocitos CD4+. Una determinación aislada de la carga viral en los primeros meses tras la seroconversión predice la tasa de progresión a SIDA con gran fiabilidad. Este poder predictivo de la viremia plasmática también se mantiene para muestras recogidas de pacientes con tiempo de infección desconocido. Niveles de viremia por encima de 30.000 copias por mL deben ser considerados elevados y de alto riesgo de progresión a SIDA a corto plazo, con independencia de la cifra de linfocitos CD4+.

En distintos estudios más de una cuarta parte de los pacientes VIH+ con más de 500×10^6 linfocitos CD4+ tenían más de 30.000 copias por mL. Hipotéticamente, este subgrupo de pacientes podría ser subsidiario de tratamiento antirretroviral precoz. Otra observación interesante del estudio se refiere a la posibilidad de reducir a un modelo de fórmula la historia natural de la infección por VIH, en la que tres variables (viremia,

recuento de linfocitos CD4+ y duración de la infección) constituyen los parámetros interrelacionados. En resumen, la cifra de linfocitos CD4+ sería inversamente proporcional a la viremia plasmática y a la duración de la infección.

En un ensayo realizado, tomando un grupo de pacientes de acuerdo con los niveles de ARN viral, se encontró que niveles de ARN por debajo del *cutt-off* del NASBA fueron directamente vinculados a un número de células CD4+ normal. Por otro lado, esta correlación se hace evidente en la infección tardía, cuando el número de células CD4+ ha caído de forma significativa. En la infección temprana, la correlación entre el número de células CD4+ y el número de copias de ARN está ausente, mientras que la relación entre los niveles de ARN y la progresión de la enfermedad se mantiene (17).

2.3 Relación entre la carga viral y el fenotipo

En un estudio en el cual se han evaluado 41 pacientes que han seroconvertido, de los cuales 20 desarrollaron VIH después de un seguimiento de 5,5 años. Entre los 41 sujetos aparecían los formadores de sincitios (SI) que progresaron, los no formadores de sincitios (NSI) que también progresaron, y los que no progresaron, que no fueron diferenciados en el momento de la seroconversión en base al número de copias de ARN o el número de células CD4+. En el momento de la seroconversión todos los individuos mostraban cadenas (NSI).

Durante el periodo temprano de la infección, el número de copias de ARN en suero de los que no progresaron disminuyó de forma significativa en comparación con los que progresaron. En el segundo periodo, tres años después de la seroconversión, el número de copias de ARN en los NSI que progresaron y en los que no, difiere de forma significativa, mientras que el número de copias en suero de los SI que progresaron y los que no, no difirió. También hay que destacar que el número de células CD4+ de los SI que progresaron fue menor de forma significativa con respecto a los que no progresaron, mientras que el número de células CD4+ en los NSI que progresaron y los que no, no difiere de forma significativa. En la infección tardía, tanto los que progresaron como los que no pueden ser diferenciados en base a los niveles de ARN, pero la distinción entre SI y NSI desaparece. Estos resultados indican que los que progresan y los que no pueden ser diferenciados en un periodo muy temprano de la infección por la determinación de los niveles de ARN y el fenotipo SI (30).

Los resultados de este trabajo muestran que un fenotipo SI o un nivel de ARN viral $> 10^{3-4}$ copias por mililitro, medido por NASBA, son indicativos de que el desarrollo de la enfermedad es eminente y la terapia beneficiosa.

2.4 Relación entre la carga viral y la antigenemia p24

Como ya se ha comentado en diversas ocasiones, el pico de antígeno p24 precede al desarrollo de anticuerpos anti-VIH. Cuando el ARN viral es cuantificado en este periodo de infección aguda los resultados corren paralelos al antígeno p24. Una vez que aparecen los anticuerpos, el antígeno p24 tiende a desaparecer mientras que el ARN viral persiste.

Los niveles de ARN viral en sujetos antígeno p24 positivos y negativos no varían, mostrando que todas las personas infectadas con el virus son positivas para este ensayo por encima del *cutt-off*, excepto algunos individuos asintomáticos por un largo periodo de tiempo. Aparentemente, en los sujetos negativos para el antígeno p24 pero positivos para el ARN, el aclaramiento del antígeno p24 es independiente del aclaramiento de la partícula viral completa. Estas observaciones indican que el

antígeno p24 es útil para el estadio, pero de menos eficiencia en la evaluación de la eficacia de la terapia, porque muchos individuos son antígeno p24 negativos y necesitan tratamiento basándose en el recuento de células CD4+ o en la carga viral (24).

Todos los estudios confirmaron que la presencia de antígeno p24 es un agente de predicción del deterioro inmunológico y desarrollo de la enfermedad. La presencia de antígeno p24 está fuertemente correlacionada con la ausencia de anticuerpos p24, indicando que la determinación del antígeno p24 está influenciada por la formación del complejo autoinmune y por la producción de anticuerpos (12).

2.5 Influencia de anticoagulantes y otros componentes del suero.

Para una muestra con una concentración viral dada, la mezcla con citrato, heparina o EDTA no ha conducido a variación significativa alguna en la eficiencia de cuantificación.

A fin de ensayar el impacto de lípidos, hemoglobina y albúmina en el desarrollo del *test*, estos componentes fueron añadidos en concentraciones crecientes a 100 µL de suero normal mezclado con 900 µL de buffer. Ninguno de los tres componentes modificó la cuantificación. Concentraciones de hemoglobina de 140 µmoles por litro, 70 gramos por litro de albúmina o 10% de lípidos no afectaron la sensibilidad y especificidad del ensayo.

SUBTIPOS DEL VIH

La técnica NASBA ha sido ensayada en los 4 subtipos principales del VIH-1: subtipos A, B, E y D. Para cada uno de estos virus, el ARN viral puede ser cuantificado tanto en stocks virales como en plasma conteniendo el virus. La eficiencia de la cuantificación es difícil de valorar. Aunque la comparación de grupos de virus con diferentes subtipos se puede realizar, es difícil la comparación entre los subtipos. Parece que el VIH-1 A, B y D pueden ser detectados con eficiencia similar, siendo menor la eficiencia para detectar el VIH-1 E.

TIPO DE MUESTRA

Se ha evaluado la utilización de sangre total, plasma o suero como fuente de ARN viral. Bajo unas condiciones apropiadas de conservación de -70 °C, no se ha observado diferencia alguna entre suero y plasma, indicando que el proceso de coagulación en las condiciones del ensayo no interfiere. Cuando se utilizó sangre total se encontró que el ARN viral resulta bastante factible a la cuantificación.

UTILIDAD CLÍNICA DE LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y PRINCIPALES APLICACIONES

- Estudio de la dinámica viral

Se producen 10^{10} partículas virales a diario en el cuerpo de un individuo afectado. El 99% de las mismas son producidas por células infectadas de forma reciente. De todos los virus celulares producidos, la mitad son eliminados cada 6 horas. De las células infectadas por el virus, la mitad son eliminadas en un periodo de 1,6 días y para mantener unos niveles de ARN viral y células CD4+ en un sujeto infectado, las células CD4+ no infectadas deben ser repuestas tan rápido como los virus (11, 14).

La cuantificación del número de partículas víricas circulantes se realiza a partir del número de copias del ARN viral presente en el plasma o suero. Presenta ciertas limitaciones, muchas de ellas inherentes a la propia naturaleza de la prueba. Cuando medimos la carga viral nos referimos a las partículas víricas o al número de copias de ARN del VIH 1 circulantes en ese momento por el torrente sanguíneo, no se tienen en cuenta el resto de localizaciones posibles del virus, donde también se replica: sistema nervioso central, bazo, tejido linfático intestinal, etc. (3, 5, 6).

El número de partículas virales circulantes en los sujetos infectados por VIH es elevado, aunque con una amplia variabilidad de unos individuos a otros. En las personas asintomáticas generalmente oscila entre 10^3 y 10^5 por mL de plasma. En un sujeto particular la carga viral es relativamente estable a lo largo del tiempo, aunque aumenta en las fases finales de la enfermedad.

Los sujetos que permanecen con viremia elevada al poco tiempo de la seroconversión presentan una rápida caída de linfocitos CD4+, que condiciona la acelerada progresión a SIDA. Por el contrario, los sujetos con viremia baja o indetectable tras la seroconversión padecen una depleción de linfocitos CD4+, aunque ésta es lenta, de forma que la progresión a SIDA sólo ocurre tras muchos años de infección. En cualquier caso, los sujetos con inmunodeficiencia avanzada y SIDA presentan mayor carga vírica que cuando estaban asintomáticos (10, 25).

En un estudio se evaluó el papel de la carga viral y el fenotipo en la progresión de la enfermedad. Se analizaron pacientes que progresaron y otros que no lo hicieron, con fenotipos SI y NSI, así como los niveles de antigenemia p24 y ARN viral. Se encontró que, con independencia del fenotipo viral, todos presentaron unos niveles séricos de ARN similares en el momento de la seroconversión.

Durante el periodo temprano de la infección, los niveles de ARN viral en los pacientes que no progresaron decayeron de forma significativa, en oposición a los que si progresaron.

La técnica NASBA puede ser aplicada en el estudio de la progresión de la enfermedad para la determinación de una evolución rápida o lenta (3, 11).

Por último, la carga viral también se ha relacionado con una menor o mayor transmisibilidad del VIH y riesgo de progresión a SIDA en las parejas sexuales, en los receptores de transfusiones y en los recién nacidos de madres seropositivas. Por tanto, la carga viral constituye un marcador de gran interés clínico, en base a la cual deben diseñarse las estrategias terapéuticas y de prevención.

- Carga viral y otros parámetros en la monitorización de la terapia

La reducción de la carga viral que experimenta un sujeto como consecuencia de un tratamiento se expresa generalmente en logaritmos en base 10 (\log_{10}). Así, si un tratamiento ocasiona una disminución de la viremia de 100 veces, esto es, del 99%, el resultado se expresa como una caída de 2 logs (6).

Los datos sugieren que los niveles de ARN medidos de forma frecuente, durante la intervención temprana, pueden distinguir entre las diferentes terapias en términos de beneficios. Además sugieren un hecho adicional y es que los niveles de antígeno p24 previos a la terapia pueden ser de ayuda en la clasificación del paciente, así como el fenotipo y el número de células CD4+; pero la medida de los niveles de antígeno p24 tras la iniciación de la terapia no ayuda en la valoración de la eficacia del régimen terapéutico. En contraste, la cuantificación regular del ARN viral en las primeras semanas de tratamiento parece ser vital para un seguimiento clínico correcto.

En un estudio doble ciego se evaluó el efecto del tratamiento con AZT sobre la carga

viral, el trabajo se enfocó en las primeras 8 semanas de tratamiento. Se monitorizaron los niveles de ARN y antígeno p24 en 28 pacientes seropositivos asintomáticos. Dieciséis de estos individuos permanecían asintomáticos cuatro años más tarde, mientras que otros 12 habían progresado a SIDA. Los niveles de ARN y el antígeno p24 fueron valorados antes de iniciar la terapia y durante las 8 primeras semanas de tratamiento con el fin de observar si se producen cambios en la carga viral en los estadios tempranos del tratamiento que sirvan de valor predictivo.

De estos participantes el 43% presentaron concentraciones de antígeno p24 detectables. Tanto los sujetos que progresaron como los que no, mostraron una caída similar en los niveles de antígeno p24 tras la aplicación del tratamiento con AZT.

El ARN viral fue detectado antes de iniciar el tratamiento por NASBA en el 82% de los participantes, con independencia de que fuesen positivos o negativos para el antígeno p24. Comparando los sujetos que eran positivos y negativos para la antigenemia p24, se observaron cambios similares durante el tratamiento con AZT. Además cuando los individuos tratados fueron comparados con una evolución clínica buena o mala, se observó una diferencia llamativa en el efecto del AZT sobre el ARN viral al pasar 4 semanas de tratamiento (11, 12).

Todos los pacientes estudiados, mostraron una caída en los niveles de ARN viral tras un mes de tratamiento con AZT, aunque el efecto fue mucho mayor en el grupo de sujetos que no progresó.

Estos resultados conllevan a unas bases de trabajo para la terapia antiviral (3, 5, 13):

- Un agente antiviral efectivo debe disminuir la carga viral de forma significativa en días o en pocas semanas.
- El fracaso común de los regímenes terapéuticos es consecuencia inevitable de la dinámica de replicación.
- El elevado nivel de mutación viral generado por una dinámica que produce aproximadamente 140 alteraciones por año argumenta a favor de una intervención agresiva y rápida.
- Para la eliminación del virus del reservorio se requiere al menos 2-3 años de reducción efectiva de la carga viral, si es posible de todo.

NUEVAS TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN TERAPEUTICA

Entre ellas cabe señalar:

- 1.- Tipación de HLA-B5701: Hipersensibilidad a Abacavir en presencia del alelo
- 2.- Ensayos de tropismo CCR5/CXCR4 y sensibilidad a Maraviroc

El tratamiento tras el fracaso de al menos dos líneas de tratamiento antiviral se ha denominado *terapia de rescate*. En esta situación y exceptuando aquellos pacientes que iniciaron tratamiento con 3 análogos de nucleosidos (AN), la mayoría de los enfermos han experimentado fracaso con las tres familias de fármacos antivirales más utilizados (13, 31).

El objetivo terapéutico en esta población es conseguir de nuevo la máxima supresión viral (<50 copias/mL). Para ello, deben existir al menos dos fármacos plenamente activos en el nuevo régimen.

Los antagonistas del CCR5 son una nueva familia de fármacos que actúan inhibiendo una de las membranas de la superficie de la célula CD4 (el correceptor CCR5). El virus necesita anclarse, por lo menos, a dos proteínas de la superficie de la célula, el receptor CD4 y el correceptor CCR5, para introducirse en ella e iniciar así su proceso de reproducción. Sin embargo, algunas formas del VIH utilizan otro correceptor, el

CXCR4. Además, algunas poblaciones virales están compuestas por virus que usan indistintamente un correceptor u otro (poblaciones duales) e incluso las hay que son una mezcla de virus CCR5, CXCR4 y duales (poblaciones mixtas).

El uso del CCR5, CXCR4 o ambos correceptores define el tropismo de la cepa viral. Por consiguiente, antes de tomar un fármaco perteneciente a esta familia de antirretrovirales es necesario conocer previamente el tropismo viral de la persona candidata a recibirlo. Para tal fin, se utiliza un test de laboratorio, conocido como *prueba de tropismo*, que determina el correceptor que emplea el VIH de un individuo para introducirse en la célula. Sólo si la prueba da como resultado un tropismo CCR5, podría incluirse este tipo de fármacos en un régimen antirretroviral con probabilidad de éxito (13, 32-35) (Fig 5).



Fig. 5. Tropismo CCR5/CXCR4

Maraviroc es un nuevo inhibidor de la entrada a la célula, que se administra por vía oral y que inhibe los correceptores de quimioquinas CCR5 (32-35) (Fig 6).

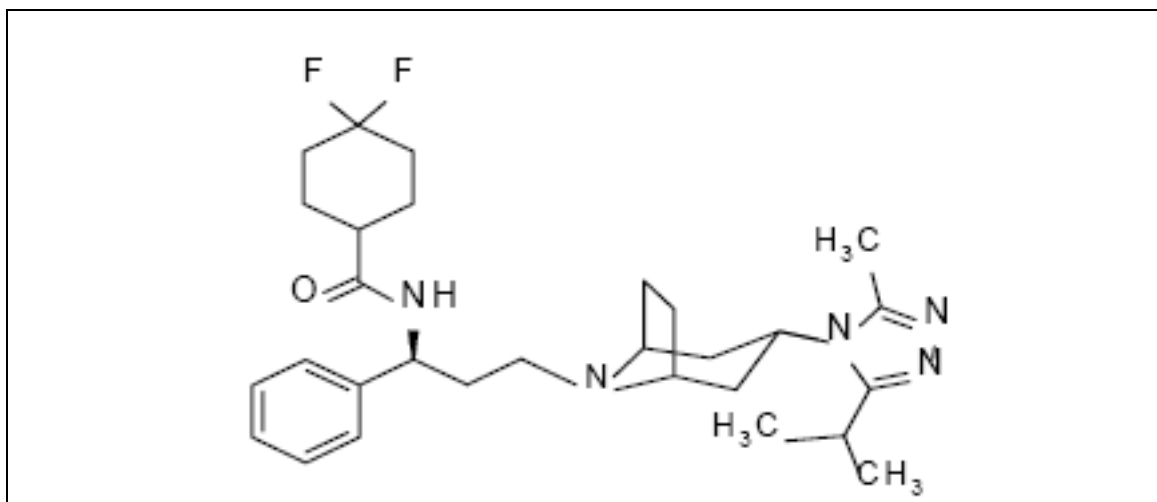


Fig. 6. Estructura química de Maraviroc

Maraviroc pertenece a una clase terapéutica denominada antagonistas de CCR5. Se une selectivamente al correceptor humano de quimioquinas CCR5, impidiendo la entrada en las células del VIH-1 con tropismo CCR5. Este fármaco presenta una

actividad potente frente a las cepas de VIH-1 con tropismo R5 y sin exposición previa a tratamiento antiviral y con mutaciones de resistencia frente a inhibidores de transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (AN), inhibidores de la proteasa (IP) e inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (NN) (36-38).

Maraviroc no presenta actividad antiviral *in vitro* frente a virus que pueden utilizar CXCR4 como correceptor de entrada (virus con tropismo dual o virus con tropismo CXCR4).

La comprobación de un tropismo viral R5 previo al uso de Maraviroc resulta fundamental para asegurar la eficacia de este fármaco. En la actualidad esta prueba sólo está disponible en pocos laboratorios de referencia. La dosis recomendada en adulto es 150 mg, 300 mg o 600 mg/ 2 veces al día dependiendo de las posibles interacciones farmacológicas con otros fármacos antivirales que reciba el paciente

En cuanto a las indicaciones clínicas la FDA dice que, en combinación con otros medicamentos antirretrovirales, está indicado para el tratamiento de pacientes adultos infectados, solo por VIH- 1 con tropismo CCR5 detectable, con replicación viral activa y resistente a múltiples agentes antirretrovirales (33-36).

Antes de administrar Maraviroc se tiene que haber confirmado, con un método de detección debidamente validado y sensible, y utilizando una muestra de sangre obtenida recientemente, que el VIH-1 detectable es virus con tropismo CCR5 únicamente.

El tropismo en los ensayos clínicos de Maraviroc se utilizó el test Monogram Trofile. Actualmente se están evaluando otros tests fenotípicos y genotípicos.

No se puede predecir de forma segura el tropismo viral mediante la historia del tratamiento ni mediante el análisis de muestras almacenadas. Cabe indicar que Maraviroc no presenta indicación en el caso de tropismo dual o mixto. Se entiende como “tropismo dual” la presencia de una cepa de virus que presenta ambos tropismos (CXCR4 y CCR5), mientras que “tropismo mixto” denota la presencia de dos cepas del virus, una con tropismo X4 y otra con tropismo R5 (13, 35-37).

BIBLIOGRAFIA

1. Beld M, Sol C, Goudsmit J, Boom R. Fractionation of nucleic acids into single-stranded and double-stranded forms. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:2618-1
2. Boom R, Sol CJA, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, Noordaa van der J. A rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990;28:495-503
3. Bruisten SM, Gemen van B, Koppelman M, et al. Detection of HIV-I distribution in different blood fractions by two nucleic acid amplification assays. *AIDS Res Human Retrov.* 1993;9:259- 265
4. Dewar R, Highbarger H, Sarmiento M, et al. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *J Infect Dis.* 1994; 170:1.172-1.179
5. Dyer JR, Gilliam BL, Eron Jr JJ, Grosso L, Cohen MS, Fiscus SA. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in cell free seminal plasma: comparison of NASBA with Amplicor reverse transcription-PCR amplification and correlation with quantitative culture. *J Virol Methods.* 1996; 60:161-170
6. Gemen van B, Beuningen van R, Nabbe A, Strijp van D, Jurriaans S, Lens P, et al. A one-tube quantitative HIV-I RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labelled probes. *J Virol Methods.* 1994;49:157-168
7. Gemen van B, Kievits T, Nara P, Huisman HG, Jurriaans S, Goudsmit J, et al. Qualitative and quantitative detection of HIV-I RNA by nucleic acid sequence-based amplification. *AIDS.* 1993;7:5107-5110
8. Gemen van B, Kievits T, Schukkink R, Strijp van D, Malek LT, Sooknanan R, et al. Quantification of HIV-I RNA in plasma using NASBA during HIV-I primary infection. *J Virol Methods.* 1993; 43:177-188
9. Gómez-Cano M, Villalba N, Bravo R, González-Lahoz J. Carga vírica y monitorización del tratamiento antirretrovírico. *Rev Clin Esp.* 1997; 196: 872-877
10. Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, Barringer KJ, Richman DD, Gingeras TR. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multi-enzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:1874-78
11. Ho D, Neumann A, Perelson A, Chen W, Leonard J, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature (London).* 1995; 373: 123-26
12. Hogervorst E, Jurriaans S, Wolf de F, Wijk van A, Wiersma A, Valk M, et al. Predictors for non- and slow progression in human immunodeficiency virus type 1 infection: low viral RNA Copy numbers in serum and maintenance of high HIV-I p24-specific but not V3-specific antibody levels. *J Infect Dis.* 1995; 171:811-8
13. Jurriaans S, Gemen van B, Weverling GJ, Strijp van D, Nara P, Coutinho RA, Koot, et al. The natural history of HIV-I infection: virus load and virus phenotype

independent determinants of clinical course? *Virology*.1994; 204:223-33

14. Jurriaans S, Goudsmit J. Fluctuations in steady state level of genomic HIV-1 RNA and replication intermediates related to disease progression rate. En: Immunological correlates of protection from HIV infection and disease, special issue of immunology letters, editado por Heeney, J. Amsterdam: Elsevier Science, 1996.
15. Jurriaans S, Weverling GJ, Goudsmit J, Boogaard J, Brok M, Strijp van D, et al. Distinct changes in HIV-1 RNA versus p24 antigen levels in serum during short-term zidovudine therapy in asymptomatic individuals with and without progression to AIDS. *AIDS Res Human Retrov*. 1995; 11:473-479
16. Kievits T, Gemen van B, Strijp van D, Schukkink R, Dircks M, Adriaanse H, et al. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-I infection. *J Virol Methods*.1991; 35:273-286
17. Loveday C, Kaye S, Tenant-Flowers M, et al. HIV-1 RNA serum-load and resistant viral genotypes during early zidovudine therapy. *Lancet*. 1995; 345: 820-24
18. Mellado Peña JM, Villota Arrieta J, Bernal Zamora A, et al. Fenotipo inductor de sincitio, resistencia a zidovudina y rápida progresión clínica en un niño infectado por VIH. *An Esp Pediatr*.1997; 46:65-68
19. Mellors J, Rinaldo C, Gupta P, White R, Todd J, Kingsley L. Prognosis in HIV infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 1996;272:1.167-1.170
20. Mulder J, McKinney N, Christopherson C, Sninsky J, Greenfield L, Kwok S. Simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol*. 1994;32:292-300
21. Ortiz de Lejarazu Leonardo, Cisterna Cáncer R, González López A, Maroto MC, Pumarola Suñé MC, Romero Viñas J. Diagnóstico microbiológico de la infección por vih. (1998). <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap6.htm>.
22. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Bethesda (MD): Department of Health and Human Services (DHHS); Jan 29. pag. 128 (2008).
23. Perelson A, Neuman A, Markowitz M, Leonard J, Ho D. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*.1996; 271:1.582-86
24. Revets H, Marissens D, Wit de S, Lacor P, Clumeck N, Lauwers S, et al. Comparative evaluation of NASBA HIV-I RNA QT, amplicor-HIV monitor and quantiplex HIV RNA assay, three methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:1058-1064

25. Rodríguez Iglesias M, Terrón Pernía A. Diagnóstico de la infección por el VIH. Cap 6. La infección por el VIH: Guía Práctica. <http://saei.org/hemero/libros/c06.pdf>
26. Schuurman R Nijhuis M van Leeuwen R et al. Rapid changes in HIV1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine. *J Infect Dis.*1995; 171:1.411-19
27. Soriano V. Medrano L. González-Lahoz J. Utilidad de la PCR en el diagnóstico de la infección por VIH. *Med Clin*,1992; 98:270-275
28. Urdea M, Wilber J, Yeghiazarian T, et al. Direct and quantitative detection of HIV-1 RNA in human plasma with a branched DNA signal amplification assay. *AIDS.*1993;7 (suppl 2):11-14
29. Van Gemen B, Van Beuningen R, Nabbe A. A one-tube quantitative HIV-1 RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labelled probes. *J Virol Methods*;.1994; 49:157-68
30. Van Kerckhoven I, Fransen K, Peeters M, De Beenhouwer H, Piot P, Van der Groen G. Quantification of human immunodeficiency virus in plasma by RNA PCR viral culture and p24 antigen detection. *J Clin Microbiol.*1994; 32:1.669-73
31. Verhofstede C, Fransen K, Marissens D, Verhelst R, Groen van der G, Lauwers S, et al. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of eight different extraction methods. *J Virol Methods.*1996; 60:155-59

AEBM

C/ CONDADO DE TREVIÑO Nº 2 PORTAL 2, LOCAL 1 • 28033 - MADRID

TFNO: 91 302 22 12 - 91 302 24 33 • FAX: 91 302 23 51

E-Mail: aebm@aebm.org • WEB: www.aebm.org