

# Pruebas de bajo costo para el seguimiento al tratamiento de VIH

(Economical assays for monitoring HIV-1 treatment)

---

Lisa Frenkel

Profesora de Pediatría y Medicina del Laboratorio

# Uso de pruebas para el seguimiento del tratamiento del VIH con antirretrovirales (TAR)

---

- Ensayos para detectar resistencia a drogas antirretrovirales
  - Antes de empezar el tratamiento para detectar resistencia transmitida y escoger las antirretrovirales
  - Con “falla viral” al TAR
    - No disminuye la carga viral
    - Ocurre un “rebound”
- Ensayos que miden la carga viral
  - Antes de empezar TAR para determinar el nivel inicial
  - Después de iniciar TAR para ver si suprime la replicación

# Pruebas para detectar resistencia a drogas en VIH-1

---

- Fenotípico:

Mediciones de la concentración inhibitoria del 50% ( $IC_{50}$ ) en construcciones virales recombinantes comparadas con un estándar de laboratorio

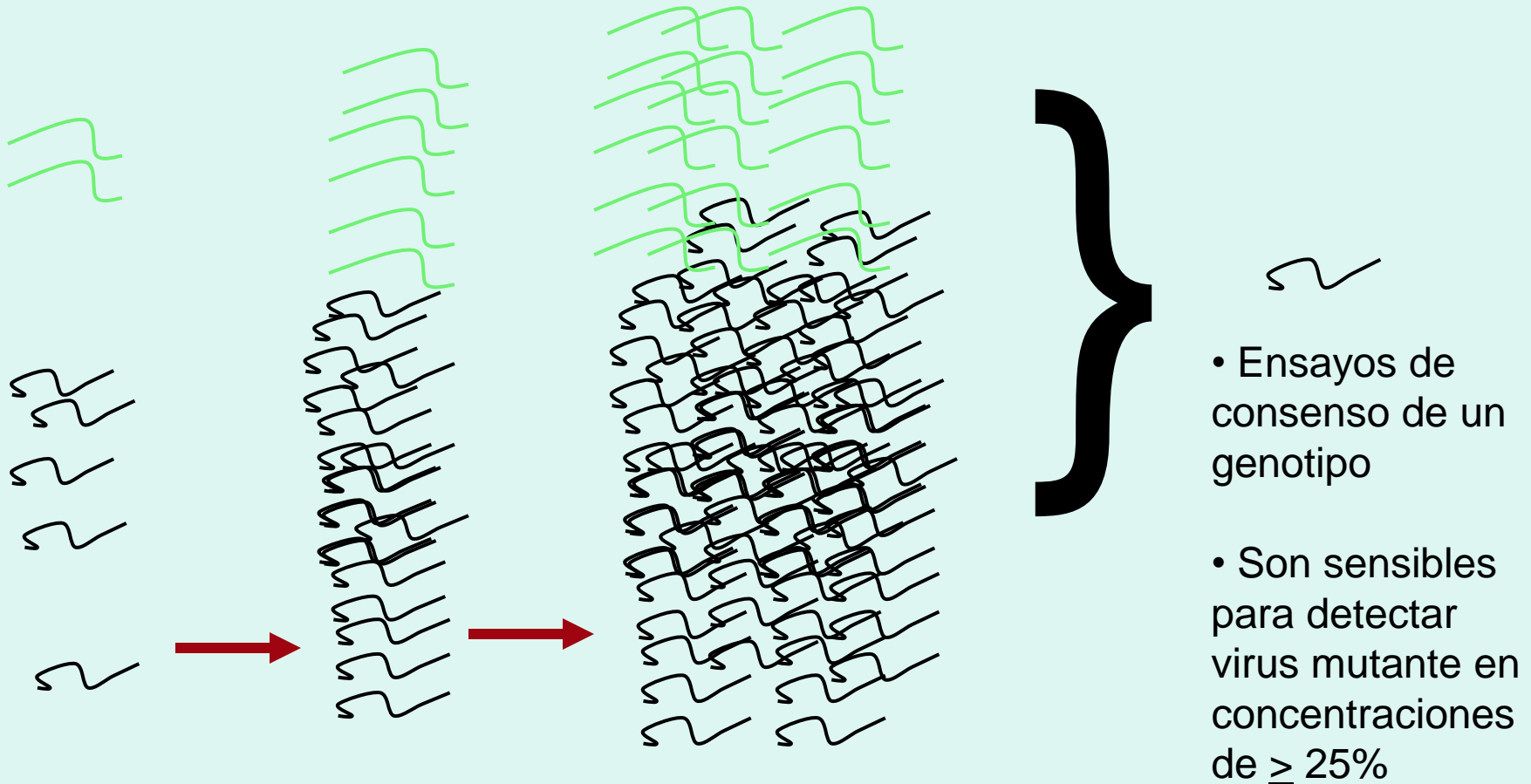
- Genotípicos:

- Secuencias de consenso o promedio
- Sensible, detecta variantes minoritarias (<25%)

# Detectar resistencia

## - Genotipo o Secuencia de Consenso -

Somete virus en la sangre al ensayo

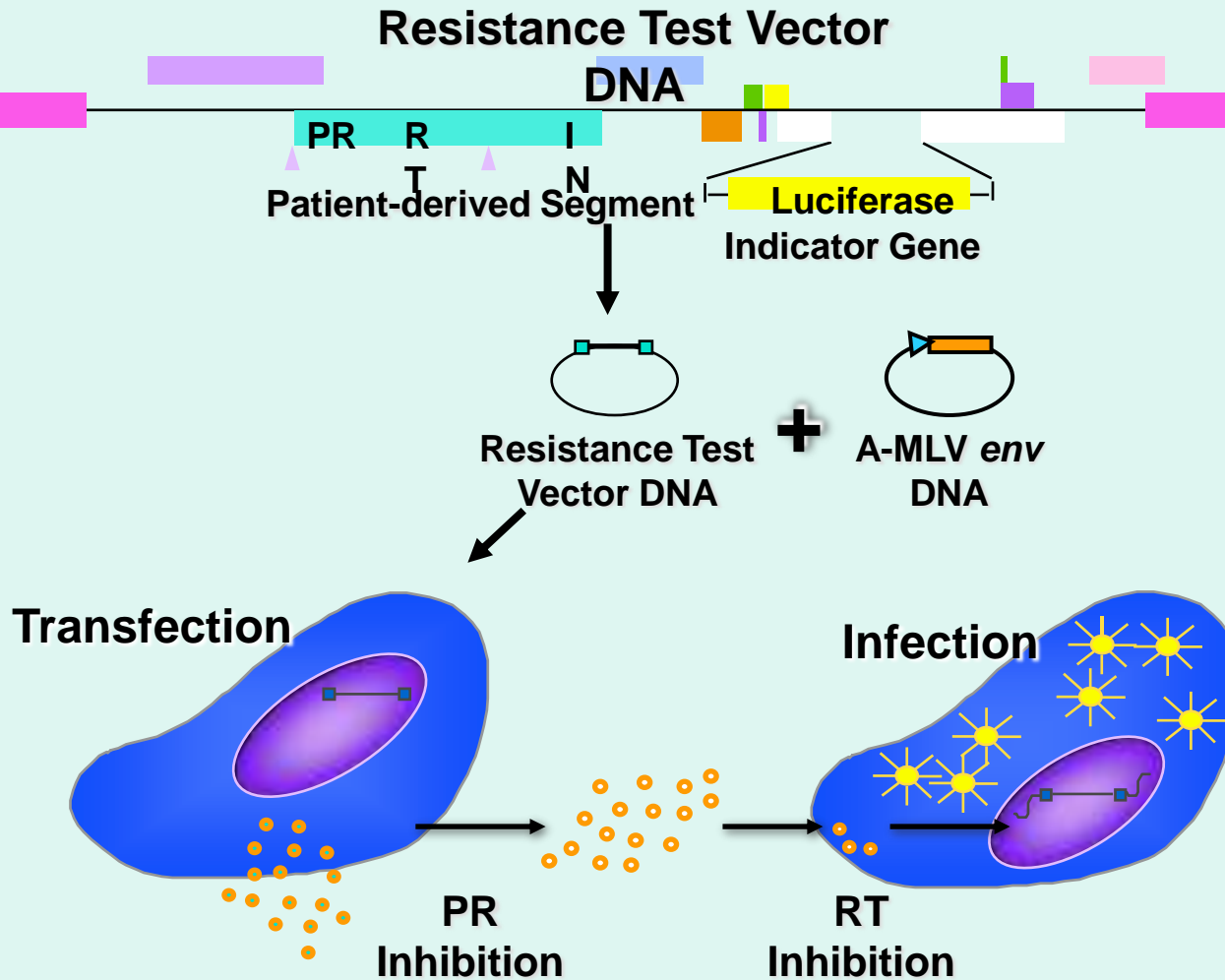


**Amplifica por PCR**

# FENOTIPO:

## Ensayo de Virus Recombinado con un Vector (ViroLogic PhenoSense™)

■ Cuesta US\$1000+ por muestra



■ El virus de ensayo se construye con el *gen pol* del VIH del paciente insertado en un VIH de laboratorio con un gen indicador (luciferaza) y sin el gen *env*

■ Se co-transfectan células con un plásmido que contiene *env* del virus anfitrión de leucemia murina

■ A las partículas virales seudo tipificadas se les mide la susceptibilidad a diluciones de la droga

■ Se compara la IC50 o IC95 del virus recombinante del paciente con el virus de laboratorio

# Métodos para determinar el genotipo del VIH-1

---

## Comercial:

- Secuenciación (cíclica con terminador de dideoxinucleótido) - **Secuencia de Consenso**
  - Kits (ABS, VGI) **COP 1,200,000 (US\$600) / muestra**
  - “métodos caseros” **COP 400,000 (US\$200) / muestra**

## Investigación:

- Secuenciación “Ultra deep” en 454, etc **COP 4,000,000 (US\$2000) /muestra**
- Ensayos para detectar mutaciones genéticas puntuales
  - PCR Alelo-específica (ASPCR) **COP 130,000 (US\$65) / codón**
  - Ensayos de Ligación de Oligonucleótidos (OLA) **COP 65,000 (US\$32) / codón**
  - Ligación y amplificación (LigAmp)

# Costo Actual para Pro forma de los Ensayos Genéticos para Detectar Resistencia de VIH

Ensayo	Equipo	Insumos	Tiempo del Tecnico (muestras en lotes)	Costo por Muestra o Codon
Consensus sequencing	Sequencer (US\$ 50K - 500K)	US\$ 150 (kit) US\$ 30	4 horas	US\$ 600 US\$ 200
Pyrosequencing	454 (US\$ 500K)	US\$ 800 (kit)	8 horas	US\$ 2000
Oligo-nucleotide Ligation Assay (OLA)	Thermocycler (US\$ 7K) EIA Reader (US\$ 10K)	US\$ 4	1 hora	US\$ 32
Allele-specific PCR (ASPCR)	RealTime Thermocycler (US\$ 70K)	US\$ 17	1.5 horas	US\$ 65

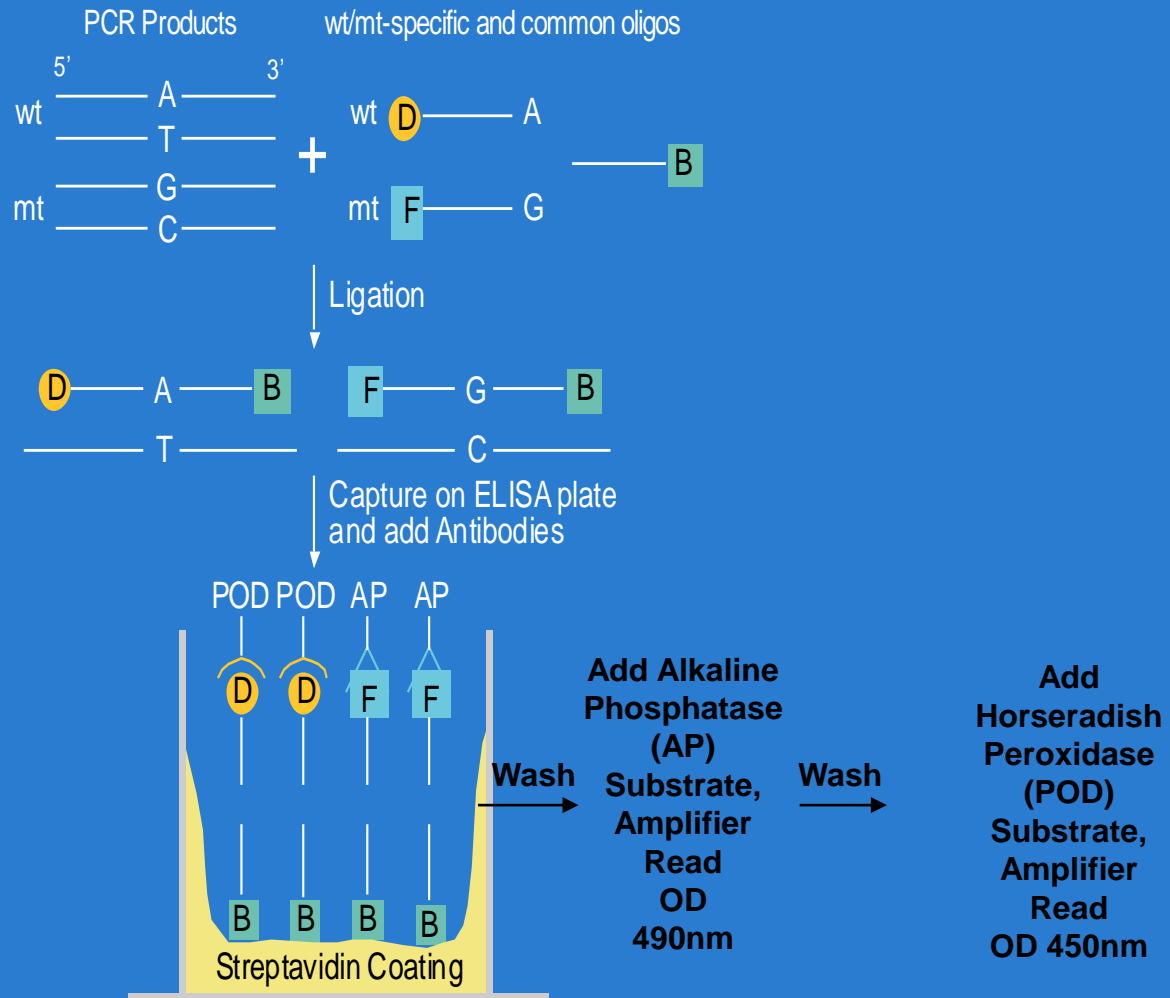
# Ensayo de Ligación de Oligonucleótidos (OLA)

## Combina:

- Amplificación por PCR
- Ligación de Oligonucleótidos
- ELISA

## Detecta:

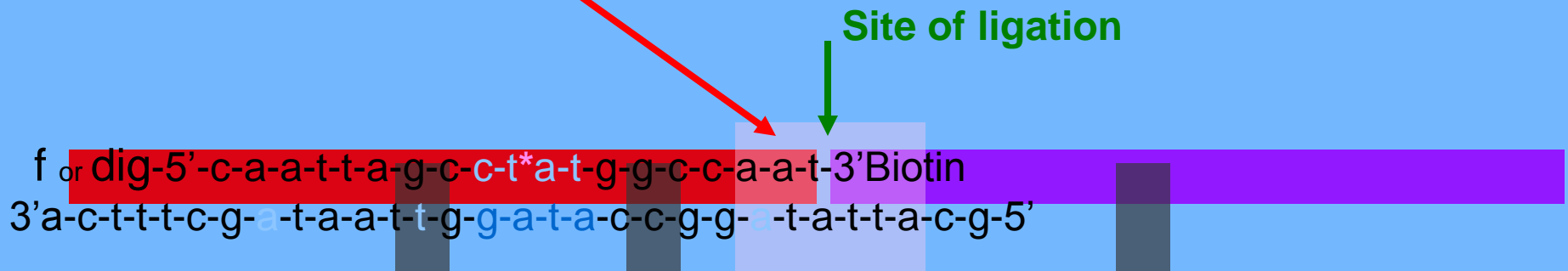
- Cambios de base únicos en templados de ácido nucleico amplificados mediante PCR





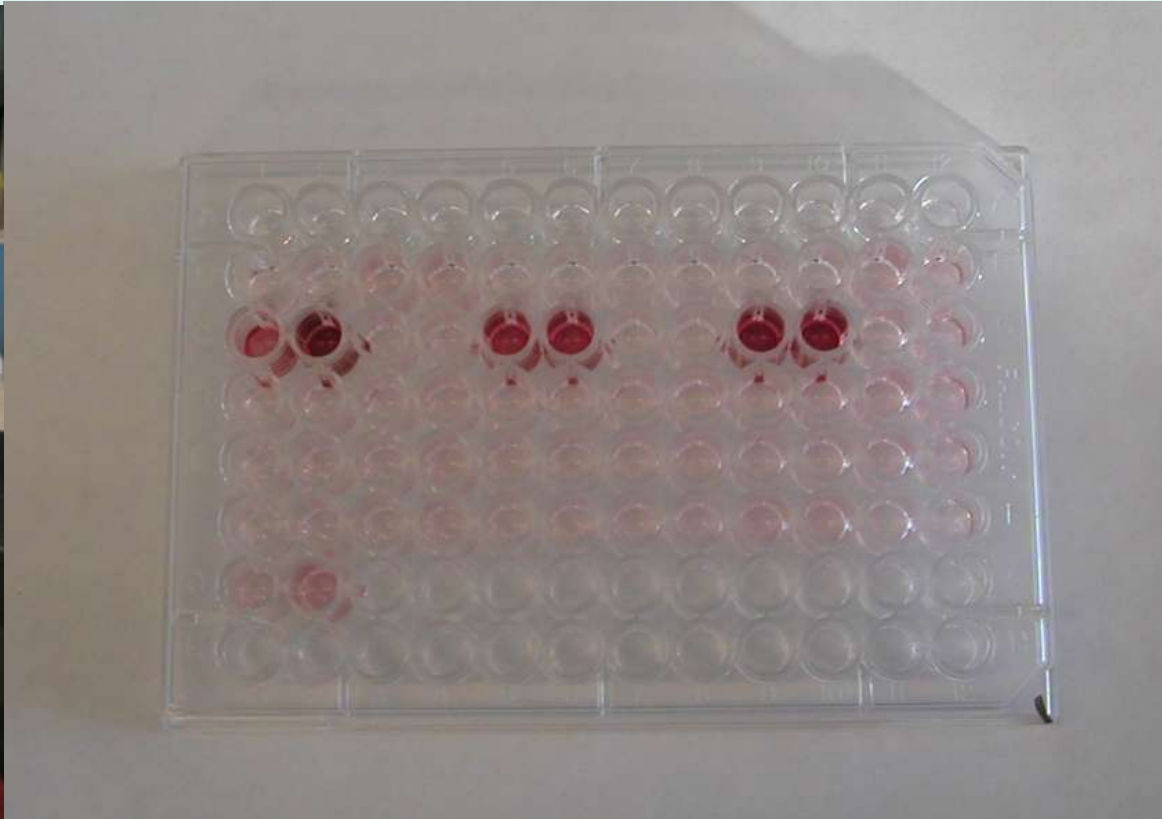
# La Ligasa le da Especificidad al OLA

- Mutaciones dentro de una región de 4 bases, incluyendo la **base de interés**, son críticas para la actividad de la ligasa
- La ligasa requiere que las dos bases terminales en cada oligonucleotido sean complementarias al ADN hibridizado



- Polimorfismos múltiples fuera de la región crítica de 4 bases ocasionalmente inhibe la ligación
- No hay ligación = no hay color = reacción indeterminada

# Ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) para resistencia de VIH



# OLA: Mutaciones analizadas

## Transcriptasa Reversa

Mutación

Resistencia a  
drogas

Mutación

Resistencia a  
drogas

<b>D30N</b>	<b>NFV</b>	<b>K65R</b>	<b>TDF, ABC</b>
<b>I50V</b>	<b>APV</b>	<b>K70R</b>	<b>AZT, d4T</b>
<b>V82S/A/T</b>	<b>RTV, IDV, LPV</b>	<b>L74V</b>	<b>ddI, ABC</b>
<b>I84V</b>	<b>all PIs</b>	<b>M184V</b>	<b>3TC, FTC</b>
<b>N88D</b>	<b>NFV</b>	<b>T215F/Y</b>	<b>AZT, d4T</b>
<b>L90M</b>	<b>SQV, NFV</b>	<b>K103N</b>	<b>NVP, EFV, DLV</b>
		<b>Y181C</b>	<b>NVP, DLV</b>
		<b>G190A</b>	<b>NVP, EFV, DLV</b>

# Limitaciones del OLA

---

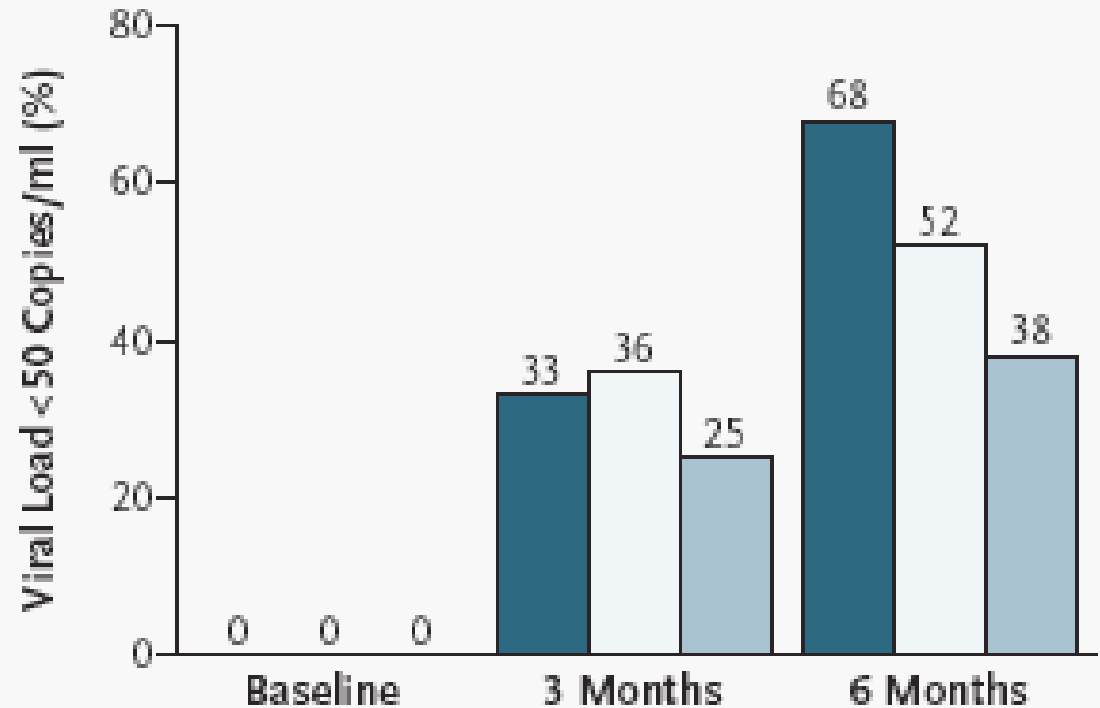
- Detecta mutaciones de resistencia primarias
- Polimorfismos pueden causar resultados indeterminados
- Reacción indeterminada
  - Garantizada
    - Mutaciones en las 2 bases complementarias al extremo 3' del oligo específico
    - 1 base adyacente a la base de interés
  - A veces indeterminada
    - Virus altamente polimorfo

# Consecuencias Clínicas de la Dosis Única de Nevirapina en las Mujeres

(Jourdain et al. NEJM 2004;351:229-40)

■ No intrapartum nevirapine    
 □ Intrapartum nevirapine, no NNRTI mutations    
 ■ Intrapartum nevirapine, NNRTI mutations

Plasma HIV RNA <50 c/ml después de 6 meses de TAR:  
 68% de mujeres sin exposición a NVP  
 vs.  
 49% de las que tomaron NVP;  
 P=0.03



### No. of Samples

No intrapartum nevirapine	47	43	40
Intrapartum nevirapine, no NNRTI mutations	143	119	119
Intrapartum nevirapine, NNRTI mutations	66	63	61

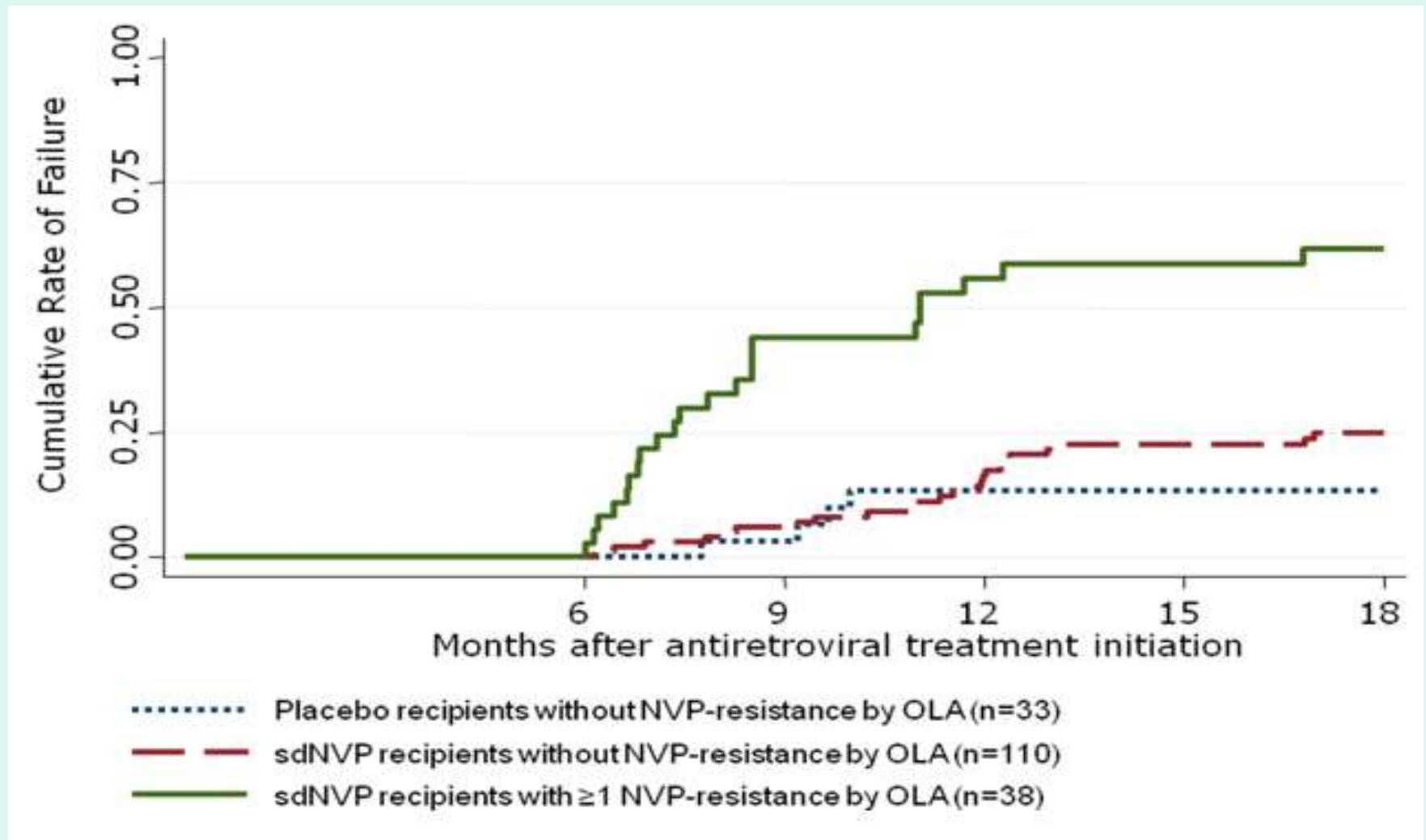
# Factores Predictivos de la Falla Viroológica

Factor	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	Hazard ratio for failure (95% CI)	P value	Adjusted Hazard Ratio (95% CI)	P value
K103N detected by OLA*	4.9 (2.6-9.4)	< .001		-
Y181C detected by OLA*	6.1 (2.6-14)	< .001		-
G190A detected by OLA*	2.8 (1.5-5.3)	.001		-
≥ 1 NVP-resistance mutations (K103N, Y181C and/or G190A) by OLA	3.8 (2.1-6.8)	< .001	2.5 (1.3-4.5)	.004
≥ 2 NVP-resistance mutations (K103N, Y181C and/or G190A) by OLA*	5.6 (2.9-11)	< .001		-
Plasma HIV-1 RNA				
- above median (4.58 log <sub>10</sub> copies/ml) during pregnancy*	2.4 (1.3-4.4)	.004	2.4 (1.3-4.5)	-
- above median (4.77 log <sub>10</sub> copies/ml) at initiation of NVP-ART	2.2 (1.2-4.1)	.01		.007
CD4 cell count				
- below median (183 cells/uL) during pregnancy*	2.0 (1.1-3.7)	.02		-
- below median (153 cells/uL) at initiation of NVP-ART	1.2 (0.65-2.1)	.61		-
Time from intrapartum single dose nevirapine to antiretroviral therapy initiation ≤ 6 months	3.4 (1.8-6.3)	< .001	3.2 (1.7-6.2)	.001
NNRTI resistance mutations detected 10 days post partum	1.4 (0.8-2.5)	.28		

<sup>†</sup> defined as confirmed plasma HIV-1 RNA >50 copies/mL between 6 and 18 months of ART.

\* Variables not included in the multivariate analysis because of co-linearity with other variables selected in the multivariate analysis

# Falla Viroológica Mayor Después de duNVP + Mutaciones Detectadas al Inicio de NVP-TAR Comparado con la Ausencia de Mutaciones o con Placebo



# Resumen del OLA

---

- Método altamente específico para la detección de mutantes resistentes a drogas
- Sensible para detectar virus mutante en concentraciones de  $\geq 2-5\%$
- Los mutantes parecen persistir a niveles mayores en PBMC que en plasma, por lo tanto el análisis de PBMC parece ser preferible
- La utilidad mayor es en situaciones con un patrón de mutaciones previsible
- Relativamente económico
- Disponible como un kit a través del National Institute of Health AIDS Research and Reagent Program



# Ensayos de Carga Viral de VIH-1 comercialmente disponibles autorizados por la FDA de EUA

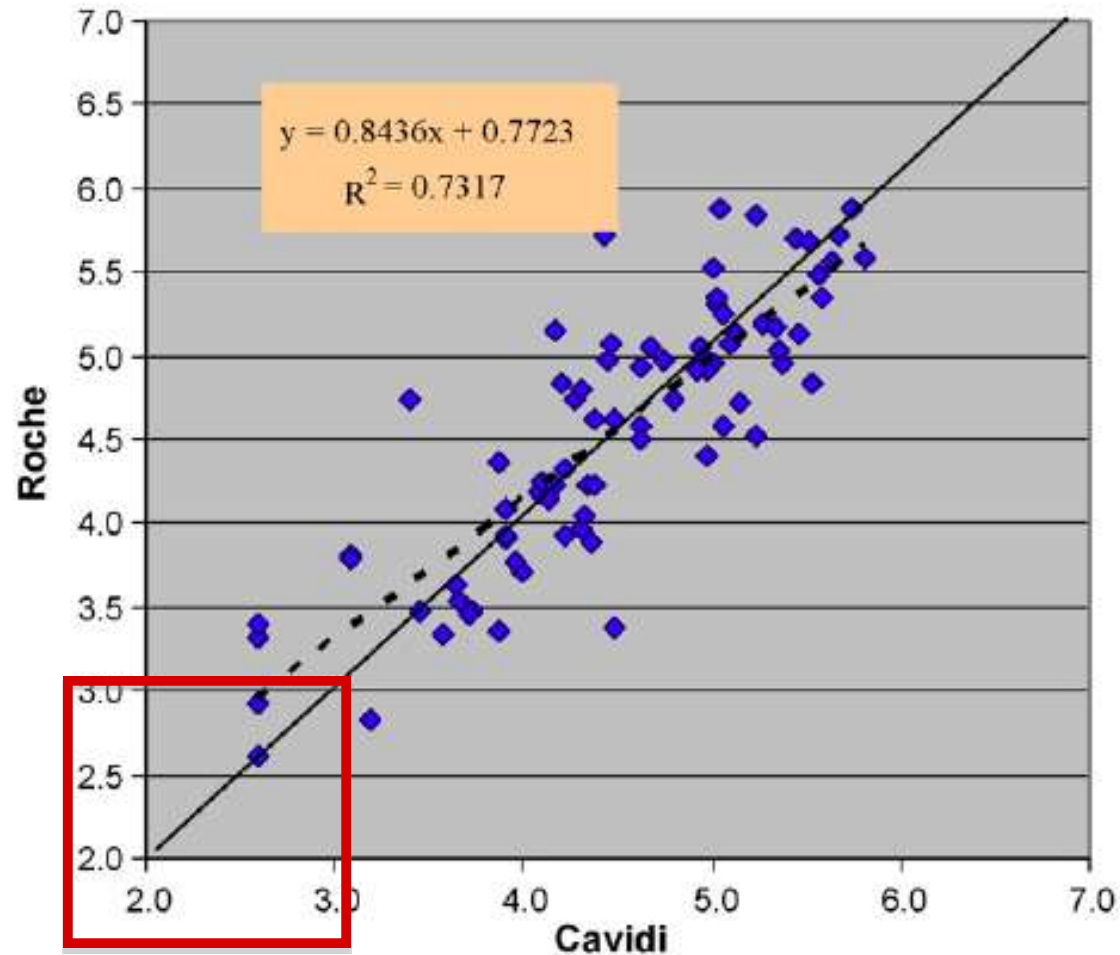
Manufacturer	Assay Name	Target	HIV-1 Subgroup Recognition	Range (RNA Copies/mL)
Roche	Amplicor HIV Monitor v1.5	Gag	Group M: A-H (underquantitates some subtypes)	Standard: 400 to 750,000
				Ultrasensitive: 50 to 100,000
Roche	COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, version 1.0	Gag	Group M: A-H (underquantitates some subtypes)	40 to 10,000,000
Siemens	Versant HIV-1 RNA 3.0 (bDNA)	Pol	Group M: A-H	U.S.: 75-500,000
				Non-U.S.: 50-500,000
Abbott	RealTime HIV-1 Assay	Int	Group M: A-H Group O, N, P	40 to 10,000,000

# Ensayos de Carga Viral comercialmente disponibles no autorizados por la FDA – 2 económicos

Manufacturer	Assay Name	Target	HIV-1 Subgroup Recognition	Range (RNA cp/mL)
Roche	COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, version 2.0	Gag and LTR	Group M: A-H	20 to 10,000,000
bioMerieux	NucliSens EasyQ HIV-1 v1.1 (US), 2.0	Gag	Group M: A-H (Underquantitates some subtypes)	50 to 3,000,000 IU/mL
Biocentric	Generic HIV Charge Virale	LTR	Group M: A-H Group N	300 to 5,000,000
Cavidi	<b>Cavidi ExaVir v.3</b>	RT	Group M: A-H, Group O, N HIV-2	~200 to 600,000 cp equivalents/mL
Perkin Elmer Life Sciences	<b>Ultrasensitive p24 Ag Assay</b>	p24	Group M Subtypes: A, B, C, E, AE, AG	Difficult to determine from package insert

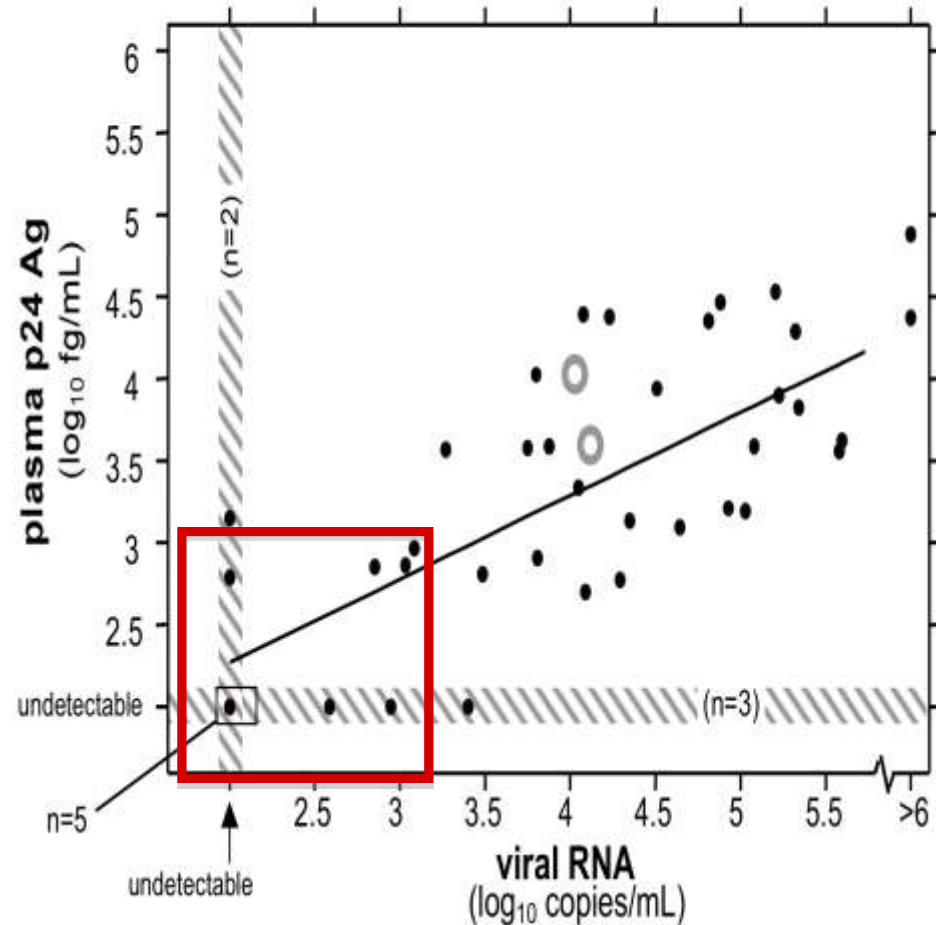
# Comparación de carga viral en plasma determinado por ensayo de Cavidí y Roche

- Ensayo de actividad de la enzima transcripción reversa (Cavadi ExaVira v.2)
  - Usa “plate reader”, lector de placas, EIA
  - Apropiado para laboratorios regionales
  - Costo de “kit” US\$ 20
- RT-PCR por COBAS Amplicor Monitor v.1.5
  - Requiere equipo grande y caro, personal técnico altamente entrenado y una manutención de instrumentos
  - Apropiado para laboratorios centralizados
  - Costo de “kit” varía US\$ 20-120



# Carga Viral de plasma en papel filtro determinado por ensayo del antígeno p24 (heat-dissociated (HD))

- Ensayo Ultrasensitivo de antígeno p24 (antígeno de “core”)
  - Usa plate reader EIA
  - Apropiado para laboratorios regionales
- No parece ser suficientemente sensible para el manejo del tratamiento
- Apropiado para laboratorios centralizados
- Costo varia, US\$ 10-50

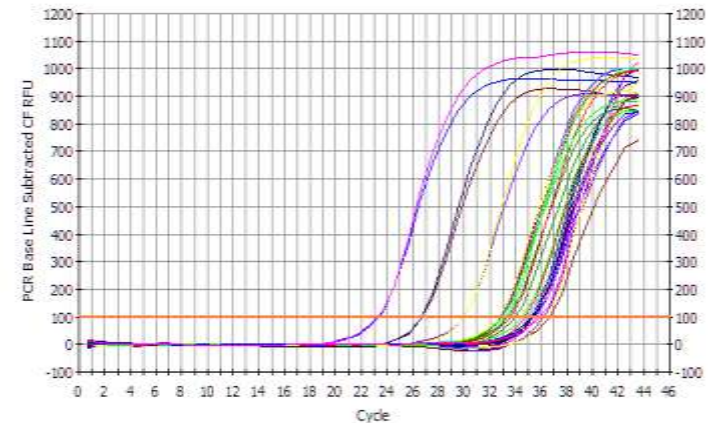


Estudio de 40 muestras de pacientes con VIH (subtipo CRF01\_AE con círculos gris)

# También económico

## Carga viral de plasma por “métodos caseros” de RT-PCR

- Establecer método en laboratorio
- Utiliza estándares globales para carga viral
  - i.e., de HIV-1 Virus Quality Assurance Laboratory
- Equipo de costo moderado
- Requiere personal técnico altamente entrenado en biología molecular
- Apropiado para laboratorios centralizados
- Costo insumos US\$ 17, con labor US\$ 65



# Ventajas-Desventajas de Ensayos de Carga Viral Disponibles

---

## PROS

- La mayoría son muy sensibles (límite de detección hasta 40-50 cp/ml) – **Necesitamos siempre este nivel de sensibilidad?**
- La mayoría reconocen a la mayoría de los subtipos del grupo M (algunos detectan O y N; uno detecta VIH-2) – **Necesitamos esta capacidad la mayor parte del tiempo?**
- La mayoría tienen un rendimiento alto – bueno para laboratorios centrales de referencia
- La mayoría funcionan con muestras de sangre seca en (DBS)

## CONTRAS

- La mayoría requieren un equipo grande y caro, personal técnico altamente entrenado y una manutención de instrumentos
- Los resultados no están disponibles por varios días o semanas así es que puede haber problemas con la entrega de resultados al paciente

**Necesitamos un ensayo viral de diagnóstico inmediato (Point of Care, POC) y económico para hospitales regionales y clínicas rurales.**

# ¿Cuáles son los obstáculos para un ensayo inmediato (Point of Care, POC) y económico de Carga Viral?

- No hay un método sencillo para amplificar la señal del virus
- Hay problema con señal no específica
- PCR sí amplifica, pero es relativamente caro

Necesitamos un ensayo viral de diagnóstico inmediato (Point of Care, POC) y económico para hospitales regionales y clínicas rurales



# ¿Dónde están los ensayos de carga viral de diagnóstico inmediato?

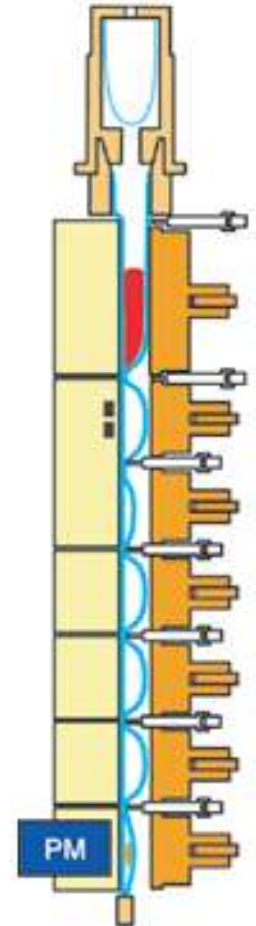
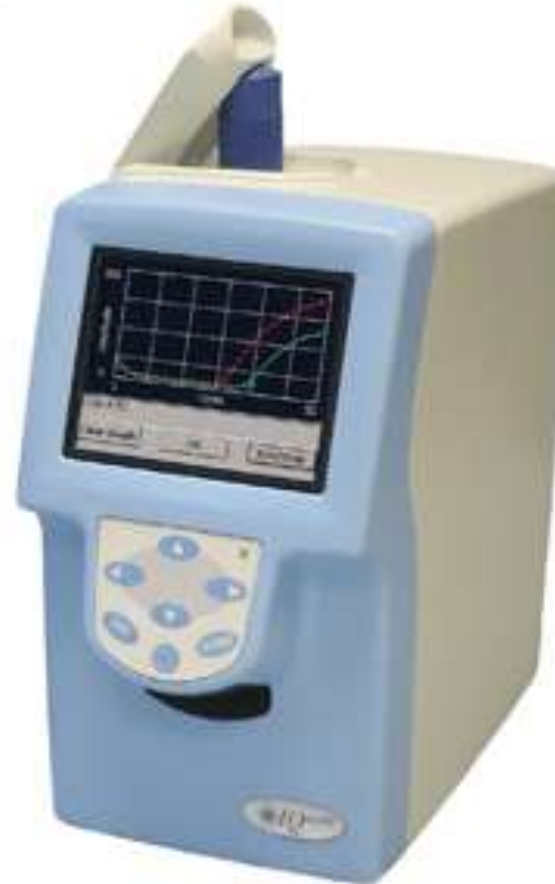
---

- David Kelso – Northwestern (Abbott-based)
- Wave 80 (Siemens-based)
- Helen Lee - Diagnostics for the Real World, Inc
- Advanced Liquid Logic
- IQuum's Liat (Lab in a tube)\*
- Inverness-Clondiag\*
- Otros?

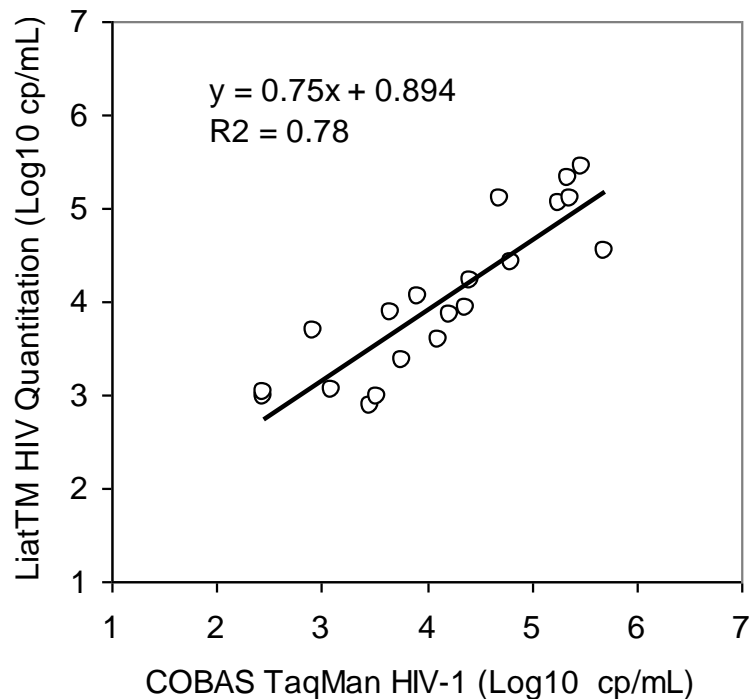


# Liat Quantitative POC HIV Assay™

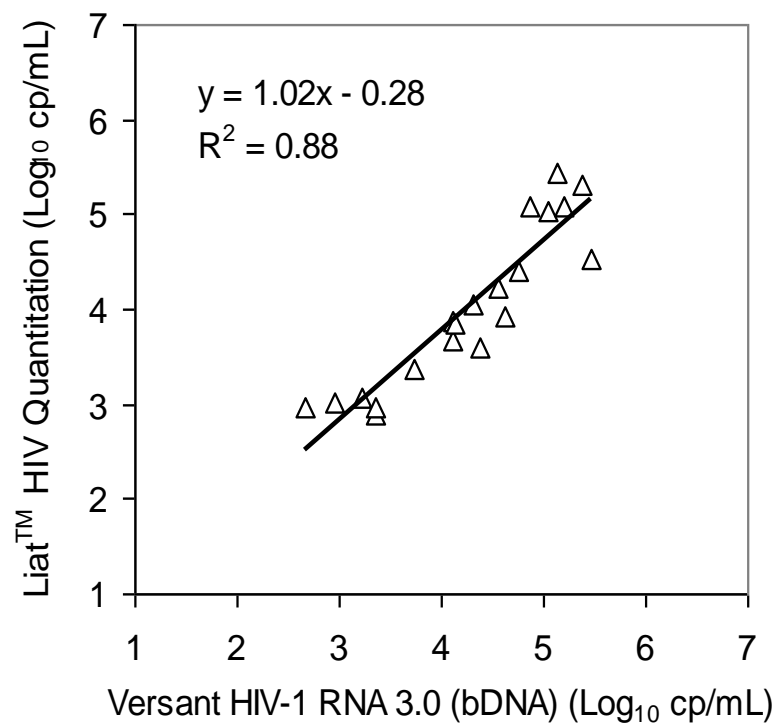
- Amplificación por PCR
- Volumen de muestra=200 uL plasma
- Limite de detección - 78 copias/mL de ARN se detectan en un ensayo de 60 min
- Rango Dinámico 100 a 10 millones de cp/mL en 60 min
- Detecta virus de los grupos M y O en VIH-1 y VIH-2 usando el panel de infección de subtipos SeraCare
- Unos datos comparativos de muestras clínicas
- Costo --?



# Pruebas de Muestras Clínicas Retrospectivas



88.4% correlation coefficients



92.0% correlation coefficients

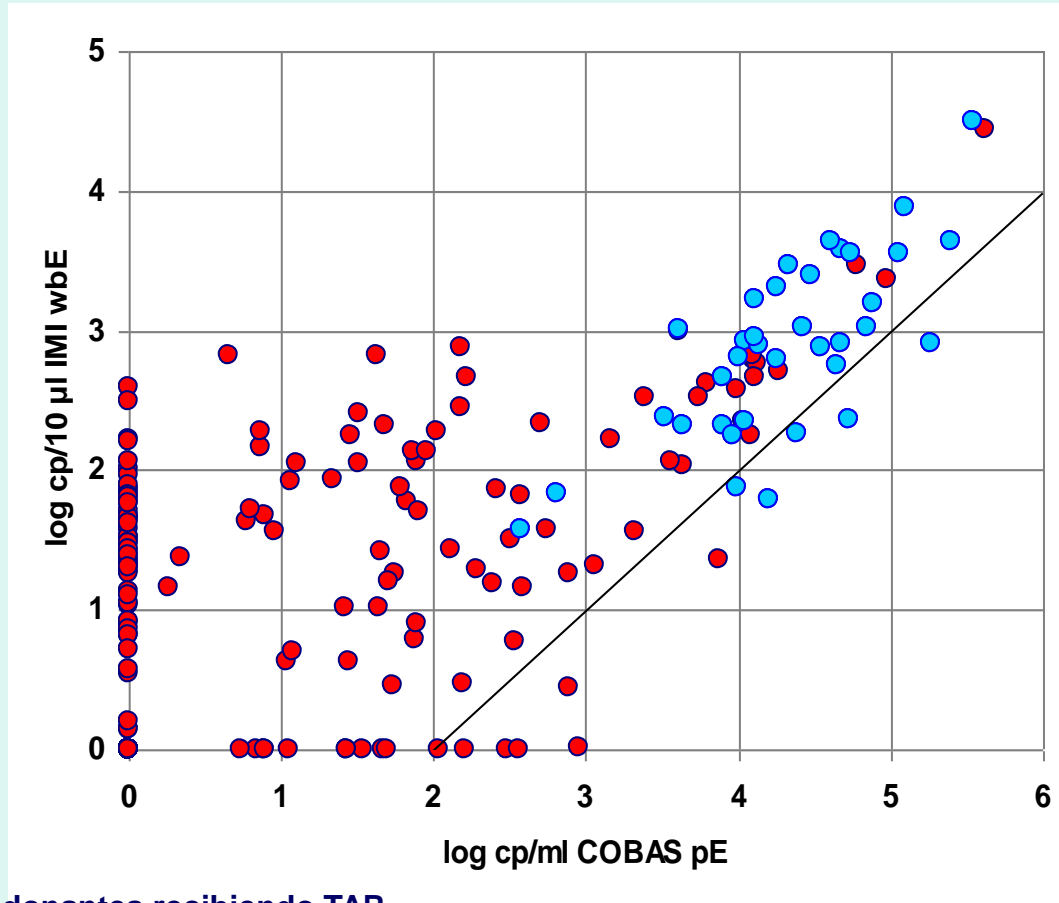
# IMI's CLONDIAG HIV Viral Load Point-of-Care Test

- Se detectan blancos múltiples en VIH-1 y VIH-2 simultáneamente mediante un método patentado de **detección en tiempo real con microarray**
- Permite determinar la carga viral de VIH en sangre y plasma obtenidos por punción digital
- El **ensayo incluye controles internos** para el rendimiento de la extracción, purificación, amplificación y detección del ácido nucleico
- **La muestra se aplica directamente sobre el cartucho de ensayo**; sin requerir manipulación, medición, dilución o mezclado de la muestra.
- El cartucho es procesado mediante un **instrumento compacto** operado por una batería (20cm x 24cm x 14cm)
- Se planea **someter esta prueba a ensayos clínicos durante el año 2010**
- **Costo ?**



# Prueba de carga viral de VIH IMI CLONDIAG

Datos generados con 1 ml de Plasma en EDTA (COBAS Ampliprep/Taqman) comparados con 10 µl de sangre (ensayo prototipo de IMI)



	IMI negativo	IMI positivo
COBAS plasma negativo	73 (28 %)	56 (22 %)
COBAS plasma <40 cp/ml	8 (3 %)	21( 8 %)
COBAS plasma positivo	6 (2 %)	94 (36%)

Porcentaje de muestras con carga viral detectable:

COBAS (1 ml plasma) 50 %

IMI VL (10 µl sangre) 66 %

*Todas las muestras son de donantes VIH positivos*

Especificidad de ambos ensayos =1 (32 donantes VIH negativo)

- donantes recibiendo TAR
- Donantes que no han recibido terapia (naïve)
- Carga viral en la sangre es igual a la carga viral en plasma

# Conclusiones

---

- Cualquiera de los ensayos de ARN disponibles comercialmente son
  - La mayoría funciona con sangre en papel filtro
  - Apropriados para laboratorios centralizados
  - Se necesita contratos para una y el mantenimiento de los instrumentos
- El ensayo Cavidí puede ser apropiado para hospitales regionales mas pequeños
- Es posible que el ensayo del antígeno p24 no sea suficientemente sensible para la monitorización de la carga viral, aunque puede ser adecuado para el diagnóstico infantil
- Los ensayos de diagnóstico inmediato (POC) están siendo desarrollados