



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURI"
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

**Tesis de Terminación de la Especialidad para optar por el Título de
Especialista en 1er grado de Microbiología Médica**

**Título: Implementación de la secuenciación de nueva
generación para la detección de mutaciones de
resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales en Cuba**

Autor: Dra. Yolanda Inés Polanco Avalos

La Habana

2024



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURI”
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

Tesis de Terminación de la Especialidad para optar por el Título de Especialista en 1er grado de Microbiología Médica

Título: Implementación de la secuenciación de nueva generación para la detección de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales en Cuba

Autor: Dra. Yolanda Inés Polanco Avalos

Tutores: Lic. Lissette Pérez Santos, DrC

Dra. Vivian Kourí Cardellá, Dr.Cs

Cotutor: Lic. Yudira Soto Brito, DrC

La Habana, 2024

Agradecimientos

Quisiera comenzar expresando mi más sincero agradecimiento a mis tutoras de tesis, la DrC. Lissette Pérez Santos y la DrC Vivian Kourí Cardellá, cuya experiencia, paciencia y apoyo constante fueron fundamentales para la realización de este trabajo. Profe Lissette su guía no solo me proporcionó claridad académica, sino también motivación en momentos de duda. Su confianza en mí me impulsó a seguir adelante y superar los desafíos.

A mi familia, especialmente a mi madre, le agradezco profundamente su amor incondicional y su apoyo constante. Su fe en mí ha sido el motor que me permitió completar este camino. A mi esposo, por sus palabras de aliento, y a mi princesa, por su presencia y cariño, gracias por ser mi pilar en los momentos difíciles. Sin ustedes, este logro no habría sido posible.

Al colectivo del Instituto Pedro Kouri, a todos mis profesores, gracias por brindarme la oportunidad de crecer académica y profesionalmente. Mi gratitud también va al Departamento de Docencia, cuyo apoyo y disposición fueron esenciales para la culminación de esta tesis. Aprecié profundamente su confianza en mí y el ambiente de aprendizaje que me ofrecieron.

Agradecerles a todos mis compañeros los cuales muchos de ellos se han convertido en mis amigos, gracias por su compañía y apoyo en los momentos de estrés y alegría, por las horas compartidas, los trabajos realizados en conjunto y las historias vividas. Ustedes fueron mi red de contención y su amistad me ayudó a mantener el ánimo en los momentos más duros. Cada uno de ustedes contribuyó a que este proceso fuera más llevadero y significativo.

Finalmente, agradezco a todos los colegas y colaboradores que participaron en esta investigación, especialmente a Rosario Gravier Hernández, Yudira Soto Brito, Lorenzo Jorge Pérez Ávila y Marelys Martínez Hernández. Su ayuda en la recopilación de datos, revisión de mi trabajo y valiosos comentarios enriquecieron este proyecto de maneras que jamás imaginé. Esta tesis es el resultado de un esfuerzo colectivo, y su colaboración fue crucial para su realización.

A todos, gracias por ser parte de este viaje.

Dedicatoria

A mi Familia

Especialmente a mi Princesa Carolina

RESUMEN

Introducción: Las pruebas de resistencia a los fármacos antirretrovirales son esenciales para la eficacia terapéutica de los pacientes infectados con VIH. La secuenciación por el método de Sanger es la prueba de referencia y detecta poblaciones virales superiores al 20 %, mientras que las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) pueden detectar poblaciones minoritarias (1 %). **Objetivo:** Implementar el ensayo de NGS para estudios genotípicos del VIH-1 en pacientes cubanos no tratados, infectados con diferentes variantes virales. **Materiales y métodos:** Se secuenciaron plasmas de 28 pacientes, por el método de Sanger y NGS Sentosa® SQ. Las secuencias se analizaron en la base de datos HIVdb de Stanford para la detección de mutaciones totales, asociadas a resistencia a drogas (MDR), niveles de resistencia antiretroviral y otros parámetros. Se calcularon los indicadores de desempeño del ensayo NGS implementado. **Resultados:** La NGS detectó más mutaciones únicas ($p=0,0006$) y MDR ($p=0,0104$) en la región de proteasa/reverso-transcriptasa. No hubo diferencia entre las medias de los niveles de resistencia a los fármacos utilizados en la terapia, para los métodos de secuencia analizados. Se observó una buena concordancia entre NGS y el método de Sanger (88,0 %). Se obtuvieron secuencias completas de las proteínas por NGS, sin embargo, con el método de Sanger, un 78,6 % (22/28) para proteasa, 85,7 % (24/28) para reverso-transcriptasa y 89,3 % (25/28) para integrasa. Únicamente se encontraron codones de parada en las secuencias obtenidas por NGS. Los subtipos más frecuentes en proteasa/reverso-transcriptasa e integrasa fueron las URF, CRFs_BG, CRF19_cpx, B, CRF18_cpx y C. **Conclusiones:** El método NGS Sentosa demostró un buen desempeño y un flujo de trabajo más optimizado para la genotipificación del VIH-1, con respecto al método de referencia. Estos hallazgos sustentan su utilidad para mejorar los resultados de la terapia antiretroviral en la atención al paciente que vive con VIH.

Palabras clave: VIH-1, Secuenciación de próxima generación, Sanger, mutaciones de resistencia, concordancia.

LISTADO DE ABREVIATURAS

3FTC	Lamivudina/ Emtricitabina
3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARV(s)	Antirretroviral (es)
ATV/r	Atazanavir/Ritonavir-potenciado
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
BIC	Bictegravir
Bs	Bisexual
CA	Cápside
CAB	Cabotegravir
CCR5	Receptor de quimoquinas CC tipo 5
CDC	Centro para el Control de las Enfermedades (del inglés, <u>Centers for Disease Control and Prevention</u>).
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
cpx	Abreviatura de complejo (por sus siglas en inglés)
CRFs	Formas Recombinantes Circulantes (del inglés, <u>circulating recombinant forms</u>)
CV	Carga viral
CXCR4	Receptor de quimoquinas CXC tipo 4
D4T	Estavudina
DE	Desviación estándar
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DOR	Doravirina
MDR	mutaciones de resistencia a los medicamentos (del inglés, <i>drugs resistant mutations</i>)
DRV/r	Darunavir/Ritonavir-potenciado
DTG	Dolutegravir
EFV	Efavirenz
Env	Gen de la envoltura del VIH-1
ETR	Etravirina
EVG	Elvitegravir
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FRs	Formas recombinantes
FTC	Emtricitabina
gag	Gen del VIH-1
HSH	Hombres que tienen sexo con otros hombres
HT	Heterosexuales
IF	Inhibidores de fusión
IINT	Inhibidores de la integrasa
INT	Integrasa viral

IPR	Inhibidores de proteasa
IPK	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”
IS	Inductores sincitios
ISP	Partículas iónicas esféricas (del inglés, <i>ionic spheres particles</i>)
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos
ITINAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos
ITS	Infecciones de transmisión sexual
LPV/r	Lopinavir/Ritonavir-potenciado
LTC4+	Linfocitos T CD4+ (grupo de diferenciación celular (del inglés, <u>cluster of differentiation</u>))
MA	Matriz del virus
min	Minutos
MINSAP	Ministerio de Salud Pública
mL	Mililitros
NC	nucleocápsida
NFV	Nelfinavir
NGS	Secuenciación de nueva generación
NIS	no inductores de sincitios
NV	Nevirapina
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pol	Gen del VIH-1
PR	Proteasa
PrEP	profilaxis pre exposición
PV VIH	personas viviendo con VIH
RAL	Raltegravir
rev	Gen regulador de la expresión viral
RPV	Rilpivirina
RT	Reverso transcriptasa
Sida	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SS	Secuenciación de Sanger
SU	glicoproteínas virales de superficie
TAMs	Mutaciones asociadas a análogos de timidina (del inglés, <i>thymidine associated mutations</i>)
TAR	Terapia antirretroviral
TARVAE	Terapia antirretroviral altamente efectiva
Tat	Gen transactivador transcripcional
TBE	Tampón de corrida tris borato etilendiamino-tetracetato.
TDF	Tenofovir
TI	Transcriptasa inversa
TM	glicoproteínas virales transmembranal
URFs	Formas Recombinantes Únicas (del inglés, <u>unique recombinant forms</u>)
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VIH-2	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2
µL	Microlitros

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	10
I.2. OBJETIVOS	14
I.2.1 Objetivo General	14
I.2.2 Objetivos Específicos.....	14
II. REVISION BIBLIOGRÁFICA	16
II.1. Historia y origen del VIH.....	16
II.2. Clasificación taxonómica.....	17
II.3. Estructura del virión.....	17
II.4. Organización del Genoma.....	18
II.5. Ciclo biológico del VIH	20
II.6. Receptores, correceptores de entrada y clasificación fenotípica del VIH-1.....	22
II.7. Historia natural de la enfermedad	24
II.8. Marcadores de la progresión de la enfermedad	25
II.9. Variabilidad genética del VIH-1. Clasificación genotípica.....	26
II.10. Epidemiología.....	28
II.10.1. Situación epidemiológica mundial	29
II.10.2. Situación epidemiológica en Cuba	29
II.11. Terapia antirretroviral	30
II.12. Resistencia viral a la terapia.....	31
II.12.1. Resistencia a los Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos	32
II.12.2. Resistencia a los Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleosides	32
II.12.3. Resistencia a los Inhibidores de la proteasa	33
II.12.4. Resistencia a los antagonistas de los correceptores (CCR5)	33
II.12.5. Resistencia a los inhibidores de la integrasa	34
II.13. Ensayos de laboratorio para la determinación de la resistencia del VIH-1 frente a los antirretrovirales.....	34
II.13.1. Ensayos de resistencia genotípica	35

III. MATERIALES Y MÉTODOS	45
III.1. Tipo de investigación, universo y muestra	45
III.1.1. Diseño del estudio.....	45
III.1.2. Universo de estudio	45
III.1.3. Criterios de inclusión.....	45
III.1.4. Criterios de exclusión.....	45
III.2. Operacionalización de las variables	46
III.3 Definiciones de términos	47
III.4 Técnicas y procedimientos	48
III.4.1 Secuenciación por el método de Sanger	48
III.4.2. Secuenciación de próxima generación	54
III.5. Análisis estadístico.....	59
III.6. Aspectos éticos	59
IV. RESULTADOS.....	62
IV.1. Mutaciones, MDR e interpretaciones de la resistencia a los medicamentos	62
IV.2. Parámetros comparados, detectados por HIVdb, en las secuencias obtenidas de PRRT e INT por ambos sistemas.....	69
IV.3. Indicadores de desempeño de los ensayos de secuenciación comparados.....	70
IV.4. Detección de subtipos y formas recombinantes.....	71
V. DISCUSIÓN	74
V.1. Mutaciones, MDR e interpretaciones de la resistencia a los medicamentos	74
V.2. Indicadores de desempeño de los ensayos de secuenciación comparados.....	79
V.3. Subtipos virales.....	85
VI. CONCLUSIONES	90
VII. RECOMENDACIONES	92
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

Hasta finales del año 2023, se estimaba que 39,9 millones de personas vivían con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el mundo, el retrovirus responsable de la pandemia del VIH/sida. Después de casi 40 años de su aislamiento, este sigue siendo una amenaza para la salud mundial ^(1, 2).

El VIH pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Lentivirinae*, género *Lentivirus*. La enfermedad producida por este virus, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), se describió por primera vez en Los Ángeles, EE. UU en el año 1981 por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, del inglés, *Centers for Diseases Control*), aunque el VIH se identificó en 1983 como agente causal de esta enfermedad ^(3, 4).

Existen dos agentes virales causantes del sida, el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), y el virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2). El primero presenta una distribución mundial y es el responsable de la mayor parte de los casos, mientras que el segundo predomina en el continente africano, aunque se reportan casos importados en Europa y América ⁽⁵⁾.

A pesar de que se realizan grandes esfuerzos para eliminar esta enfermedad, 1,3 millones de personas contrajeron la infección por el VIH en el año 2023 y 630.000 personas fallecieron a causa de patologías relacionadas con el sida en todo el mundo ⁽²⁾.

En Cuba, los primeros casos de VIH se diagnosticaron en el año 1986. Según datos de la vice-dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública (MINSAP), hasta el cierre del año 2023 se reportan 41.179 personas infectadas con VIH-1, de las cuales sobrevivieron 32.758. El mayor número de casos corresponde al sexo masculino, lo que constituye más del 80,0 % de los casos diagnosticados, específicamente los hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) representan el 89,9 %. En el año 2001 se decide comenzar la producción de antiretrovirales (ARVs) y en el 2003 se logra una cobertura completa de tratamiento ⁽⁶⁾. Tras la introducción de la terapia antiretroviral de alta eficacia (TARVAE) en el 2001, se constató una disminución significativa de la morbi-mortalidad por el VIH/sida. Actualmente, 27.909 personas se encuentran en régimen de TARVAE ⁽⁷⁾.

La epidemia de VIH-1 en Cuba está caracterizada por una diversidad genética viral, en contraste con el resto de la región del Caribe ^(8, 9). Las formas genéticas reportadas incluyen a los subtipos puros A, B, C, G, H, J y a las CRFs (del inglés, *circulating*



recombinant forms) cubanas: CRF (20, 23, 24)_BG, CRF18_cpx y CRF19_cpx ^(10, 11). Actualmente, el subtipo B mantiene una alta prevalencia, sin embargo las CRFs (20, 23, 24)_BG y varias URFs (del inglés, *unique recombinant forms*) incrementan su incidencia anualmente ⁽¹²⁾. En particular, la CRF19_cpx se asocia con progresión rápida al sida ⁽¹³⁾.

En el año 1987 se introduce a nivel mundial la terapia ARV, hallazgo que produjo un incremento sustancial en la supervivencia y en la calidad de vida de los pacientes infectados con el VIH-1 ⁽¹⁴⁾. Existen hoy seis familias de fármacos ARVs empleadas en el tratamiento de la infección por VIH-1. Entre ellas están los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN), inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN), inhibidores de la proteasa (IPR), los inhibidores de la cápside, inhibidores de la integrasa (IINT) y los inhibidores de la entrada; que incluyen inhibidores de fusión (IF), antagonistas de los correceptores, inhibidores de la fijación y de la post-fijación ⁽¹⁵⁾.

En el 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó la estrategia 90-90-90 y eleva esta meta en marzo de 2021 a 95-95-95. Con ella, aspira a reducir y poner fin a la pandemia de VIH. Para ello, el 95 % de los pacientes deben ser diagnosticados tempranamente, deben recibir terapia antirretroviral (TAR) todos los diagnosticados (independientemente del estado inmunológico) y se espera que más del 95 % logre la supresión virológica ⁽¹⁶⁾. La Agenda 2030 de las Naciones Unidas para el Desarrollo Sostenible y la Estrategia Global del Sector de la Salud sobre el VIH de la Organización Mundial de la Salud, 2016 a 2021, se han comprometido a poner fin a la epidemia de SIDA para 2030 ⁽¹⁷⁾.

La resistencia ARV es uno de los factores clave que inciden en alcanzar la supresión virológica por encima del 95 %, y es una de las principales causas de fallo de los regímenes de tratamiento. Su emergencia disminuye los beneficios sostenidos de la TARVAE, aún más cuando la resistencia puede transmitirse de un individuo a otro. Este aspecto constituye una amenaza para los avances mundiales en el tratamiento y la prevención de la infección por VIH-1 logrados en la última década ⁽¹⁸⁾. Actualmente se requiere una estrecha vigilancia de los niveles de resistencia ARV, tanto en pacientes no tratados, como en aquellos que se encuentran bajo terapia ARV ⁽¹⁹⁾.

Las pruebas de resistencia a los medicamentos antirretrovirales se realizan mediante un análisis de secuencia del gen de la polimerasa (*pol*) del VIH-1, incluidas las regiones que codifican para las proteínas transcriptasa inversa (RT), proteasa (PR) e integrasa (IN), las



que son blanco de los medicamentos contra el VIH más comúnmente utilizados: ITINAN, ITIAN, IPR e IIN ⁽²⁰⁾.

La secuenciación de nucleótidos que conforman la molécula de ADN representa el análisis más detallado de su estructura y una herramienta eficaz para identificar variantes en el material genético. La secuenciación de Sanger (SS) supuso, en la década de los 1970, una revolución importante en la genética humana y sentó un importante precedente en el origen de la era genómica. Sin embargo, en los últimos años se desarrollaron nuevas plataformas de secuenciación denominadas de alto rendimiento o nueva generación (NGS, del inglés, *Next-Generation Sequencing*). Estas herramientas son capaces de generar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación. Con su aplicación se eleva significativamente el rendimiento del proceso de secuenciación, a un menor costo y con ventajas significativas respecto a los sistemas convencionales ⁽²¹⁾.

La secuenciación de Sanger, es el método de referencia que se utiliza principalmente para identificar mutaciones de resistencia a los medicamentos (MDR, del inglés, *drugs resistant mutations*) empleados para inhibir la replicación del VIH-1 ⁽²⁰⁾.

El desarrollo de la secuenciación de próxima generación o secuenciación masiva, abrió un nuevo campo para el estudio e identificación de las MDR y su aplicación se introduce cada vez más en el diagnóstico clínico. Los métodos de NGS pueden llegar a detectar las MDR presentes en un porcentaje menor o igual al 5 % de la población viral que infecta al paciente. Sin embargo, mediante el método de secuenciación de Sanger se logra la identificación de dichas mutaciones en aquellas variantes virales que están presentes en un porcentaje por encima del 20 %. Varios estudios demuestran que la detección de MDR presentes en un porcentaje bajo se asocian con fracaso terapéutico, particularmente aquellas relacionadas con resistencia a los ITINAN ^(20, 22, 23).

Una de las plataformas comerciales semiautomáticas basada en NGS, recientemente desarrollada para la detección de resistencia a los medicamentos contra VIH-1, es el Sentosa® SQ (Vela *Diagnostics*, Singapur). Este ensayo utiliza un sistema robótico para la extracción de ARN y la preparación de bibliotecas. Las MDR en los genes que codifican para la RT, PR e IN se identifican mediante secuenciación de semiconductores de iones junto con un sistema informático integrado para el análisis de datos y la elaboración de informes. El NGS Sentosa® SQ, recibió la aprobación para su uso en el diagnóstico *in vitro* a partir de comparaciones de dicho método con respecto al método de Sanger. En un estudio realizado por Weber y cols., en 2019, los autores demostraron un



mayor rendimiento del sistema NGS Sentosa® SQ, lo que reafirma sus ventajas y desventajas ⁽²⁰⁾.

Los métodos de NGS proporcionan una sensibilidad mejorada para detectar el VIH que utiliza el correceptor CXCR4 o X4, lo que tiene implicaciones para la recuperación inmunitaria, la progresión clínica y la respuesta virológica a los antagonistas de CCR5 ^(18, 24). En una era en la que la TAR está indicada para toda persona que viva con VIH-1, la genotipificación del VIH-1 sigue siendo clave, tanto para el tratamiento clínico como para la vigilancia, y desempeñará un papel esencial para poner fin a la pandemia del VIH-1 en las próximas décadas ⁽²⁵⁾.

A partir del año 2009 se implementó en Cuba la tecnología para determinar las mutaciones del VIH-1 que confieren resistencia a los fármacos ARVs, mediante el método de secuenciación de Sanger ⁽²⁶⁾. Recientemente, el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, como parte del fortalecimiento de sus capacidades tecnológicas, adquirió un sistema de NGS Sentosa® SQ (Vela *Diagnostics*) que consta con el paquete para las pruebas genotípicas del VIH-1.

La secuenciación por el método de Sanger se utilizó durante décadas para diagnosticar la resistencia a los medicamentos contra el VIH-1 y se demostró que es altamente reproducible en diferentes entornos clínicos. Por el contrario, las tecnologías NGS evolucionaron rápidamente, lo que trajo consigo cambios en los protocolos de análisis bioinformático y de laboratorio ⁽²⁷⁾. Debido a la reciente introducción de NGS Sentosa® SQ (Vela *Diagnostics*) en el diagnóstico clínico, y en particular en Cuba, cuya epidemia de VIH-1 se caracteriza por una gran variabilidad viral, el presente estudio se propone, implementar el ensayo de NGS para estudios genotípicos del VIH-1 en pacientes cubanos no tratados, infectados con diferentes variantes virales.

Problema científico

El ensayo de secuenciación masiva Sentosa® SQ (Vela *Diagnostics*) resulta más sensible y específico que el método de Sanger para la obtención de datos referentes a estudios genotípicos en pacientes cubanos no tratados infectados con diferentes variantes genéticas del VIH-1.



I.2. OBJETIVOS

I.2.1 Objetivo General

Implementar el ensayo de secuenciación de nueva generación para estudios genotípicos de VIH-1 en pacientes cubanos no tratados, infectados con diferentes variantes virales.

I.2.2 Objetivos Específicos

1. Detectar las mutaciones virales relacionadas o no, con resistencia a los fármacos ARVs, por secuenciación Sanger y secuenciación de nueva generación.
2. Correlacionar los diferentes niveles de resistencia a cada fármaco, asignados por los dos métodos de secuenciación empleados.
3. Evaluar los indicadores de desempeño de la secuenciación de nueva generación contra la secuenciación Sanger, como prueba de referencia, para los diferentes subtipos y formas recombinantes identificadas.
4. Comparar los subtipos y formas recombinantes del VIH-1 identificados en las secuencias virales obtenidas con las dos metodologías de secuenciación empleadas.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

II.1. Historia y origen del VIH

A principio de la década de los 80, jóvenes homosexuales en los Estados Unidos comenzaron a enfermarse y morir de infecciones oportunistas que su sistema inmunológico debería haber defendido. Los médicos estaban desconcertados y el miedo se extendía por la comunidad gay con cada nuevo caso, de lo que se denominó la “plaga gay”. Casi sin excepción, los pacientes experimentaron un rápido descenso y la muerte, mientras sus médicos trataban en vano una infección oportunista tras otra.⁽²⁸⁾ Como hallazgo de laboratorio se observó que todos estos individuos mostraban una marcada depleción del grupo de diferenciación celular de los linfocitos T CD4+ en sangre periférica.⁽²⁹⁾

En septiembre de 1982, el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) denominó esta enfermedad como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) en EE. UU y también en Francia y España. En 1983, el CDC documentó su transmisión heterosexual, un hallazgo que comenzó a cambiar la percepción del sida como una enfermedad exclusiva de los homosexuales.⁽²⁸⁾

El agente causal de esta enfermedad, el VIH se descubrió en 1983, a los dos años de la comunicación de los primeros casos de sida, por el grupo de Françoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier en el Instituto Pasteur de París, y posteriormente en 1984 por el propio grupo de Robert Gallo en el Instituto Nacional de salud en Bethesda, EE. UU En 1986 se acordó la denominación de virus de la inmunodeficiencia humana.⁽³⁰⁾ Este mismo año, otro retrovirus relacionado con el VIH-1, pero con características inmunológicas distintivas y menor patogenicidad, fue aislado de individuos residentes en el Oeste de África, al que se le denominó Virus de Inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2).⁽³¹⁾

A partir del aislamiento, el clonaje molecular y la clasificación inicial del VIH-1 se caracterizaron varios lentivirus de primates genéticamente distintos y se determinó su relación filogenética con el VIH. El VIH-1 se relaciona más con el virus de la inmunodeficiencia de los simios (chimpancés, *Pan troglodites troglodites*), el que, a diferencia de otros virus de inmunodeficiencia de simios, contiene un gen llamado vpu que



también está presente en el VIH-1.⁽³²⁾ El VIH-2 está filogenéticamente más relacionado al virus de la inmunodeficiencia de los simios (sooty mangabey) (SIVsmm, siglas del inglés, simian immunodeficiency virus in sooty mangabey monkeys) con una similitud de sus secuencias nucleotídicas de un 75 %.⁽³³⁾

II.2. Clasificación taxonómica.

El VIH-1 pertenece a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*. Se conocen siete subfamilias de retrovirus: los *Alfaretrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* y *Espumaretrovirus*. Los *Deltaretrovirus* y los *Lentivirus* son las únicas subfamilias de retrovirus que hasta el momento se asocian con una enfermedad en humanos. Los *Lentivirus*, como su nombre sugiere, causan una enfermedad lenta y producen inmunodeficiencia en ovejas, caballos, ganado, simios y humanos.⁽³⁴⁾

II.3. Estructura del virión.

Los viriones inmaduros del VIH tienen forma icosaédrica y las partículas maduras pasan a ser cónicas. Tienen un tamaño de 100 a 120nm y son virus envueltos. Los elementos que forman parte de su estructura consisten en: una envoltura lipoproteica, en la que se encuentran insertadas las glicoproteínas virales de superficie (gp120, SU) y transmembranal (gp41, TM); la matriz del virus (p17, MA), la cápsida (p24, CA) y más al centro una compleja estructura formada por la nucleocápsida (p7, NC) y dos moléculas de ARN genómico. Además, se encuentran tres enzimas que son necesarias para el ciclo replicativo: la proteasa (p11, PR), la transcriptasa inversa (p66/p51, TI) y la integrasa (p31, INT). La transcriptasa inversa y la integrasa se encuentran unidas al genoma viral y la proteasa no está unida, pero está ubicada dentro de la nucleocápsida. (Figura 1) ^(29, 35)

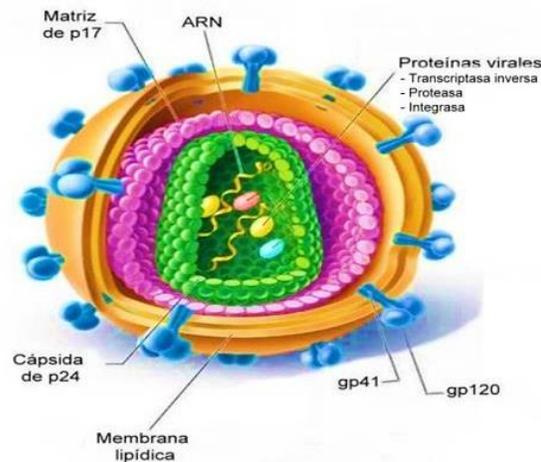


Figura 1. Esquema general de la estructura de la partícula de VIH.

Fuente: (36)

II.4. Organización del Genoma

El genoma del VIH es lineal, constituido por 9,8 kilobases. El material genético del virus contiene tres genes estructurales, dos reguladores y cuatro genes accesorios o auxiliares. Los genes estructurales se nombran: *gag* (grupo antígeno específico), *pol* (polimerasa) y *env* (envoltura). Los genes reguladores son el transactivador transcripcional (*tat*) y el regulador de la expresión viral (*rev*); ambos codifican para proteínas de bajo peso molecular que son esenciales para la replicación viral y que no forman parte de la partícula viral. Los genes auxiliares no son esenciales para la replicación viral *in vitro* y se nombran *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*, pero *in vivo* participan en la patogenia de la enfermedad.^{(37) (38)}

Los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) de *gag* y *pol* son transcritos formando poliproteínas que son escindidas por la proteasa viral (codificadas por *pol*) para formar, entonces, proteínas funcionales individuales. El producto del gen *env*, gp160, es escindido por una proteasa celular en gp120 y gp41, que son ensambladas en forma de trímeros en la envoltura viral (Figura 2).⁽³⁹⁾

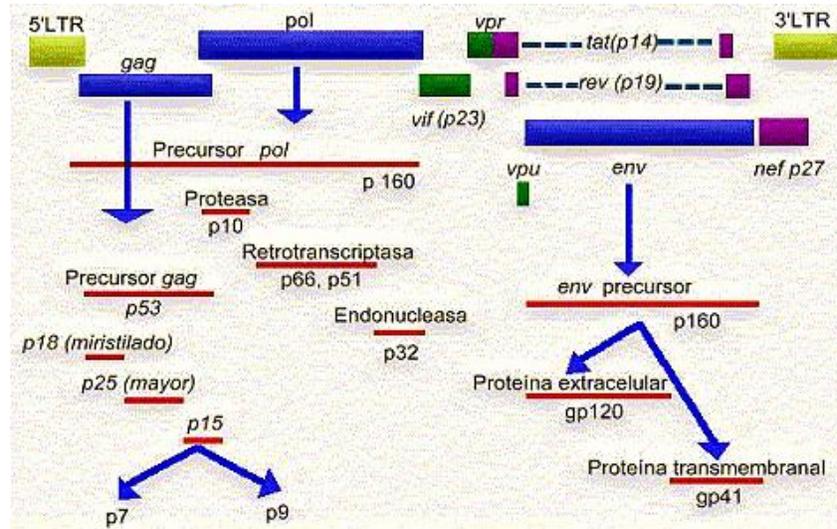


Figura 2. Organización del genoma del VIH-1.

Fuente: ejb.ucv.cl/.../Asparchivos/capitulo011fig.htm

Tabla 1. Tamaño, localización y función de las proteínas que codifican los 9 genes de VIH-1

Nombre	Tamaño	Función	Localización
<i>Gag</i>			
MA	p17	Anclaje de la membrana Transporte al núcleo	Virión
CA	p24	Cápside	Virión
NC	p7	Nucleocápside, unión a ARN	Virión
	p6	Unión a Vpr	Virión
<i>Pol</i>			
PR	p15	Corte de Gag/Pol y maduración	Virión
RT	p66,p51	Retrotranscripción y actividad ARNsa H (p15)	Virión
IN	p31	Integración del Provirus	Virión
Env	gp120/gp41	Glicoproteína de envoltura, Unión a CD4 y co-receptores	Membrana externa del virión
Tat	p16/p14	Transactivador transcripcional	Núcleo y nucleolo
Rev	p19	Transporte de ARN fuera del núcleo	Vehículo nucleolo-citoplasma
Vif	p23	Infectividad (anula A3G)	Citoplasma y virión
Vpr	p10-15	Transporte nuclear, estabiliza ciclo celular en G2/M	Virión
Vpu	p16	Liberación de partículas en la membrana (anula Tetherin)	Membrana
Nef	p27-25	Inhibe la expresión de CD4 y HLA clase I	Membrana y citoplasma

CA: cápside; **INT:** integrasa; **MA:** matriz; **NC:** nucleocápside; **PR:** proteasa; **TI:** retrotranscriptasa.

Fuente: (30)



II.5. Ciclo biológico del VIH

Entrada del VIH en la célula

La entrada del VIH en la célula se produce mediante la interacción secuencial con dos receptores, CD4 y los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 (fig. 3). La interacción inicial se produce entre gp120 y la molécula CD4 e induce una serie de cambios conformacionales que exponen el dominio V3 y regiones adyacentes que forman el dominio de unión de la gp120 a los receptores de quimiocinas. Esta segunda interacción induce nuevos cambios en la estructura de la gp41 que expone en la región N-terminal un dominio altamente hidrofóbico que se ancla en la membrana plasmática. Esta estructura inestable genera un movimiento de unión de los dominios heptaméricos de la gp41 y durante este proceso de cierre o plegamiento la membrana plasmática y viral se aproximan y fusionan. Además de estos dos receptores virales, las células dendríticas presentan en su superficie las lectinas DC-SIGN y L-SIGN, que unen de forma inespecífica virus entre los que se incluyen el VIH. La unión del VIH a estas lectinas facilita e incrementa enormemente la infección de los linfocitos circundantes. Este fenómeno, denominado de facilitación en *trans*, hace de la interacción entre dendríticas y linfocitos, denominada sinapsis inmunitaria, una zona preferente de propagación del VIH a linfocitos CD4.⁽⁴⁰⁾

Decapsidación, retrotranscripción e integración viral

Una vez fusionadas las membranas viral y celular, se produce la internalización de la nucleocápside y la decapsidación del genoma vírico. En este proceso, las proteínas de la cápside se desensamblan y liberan el genoma viral. Este paso es inhibido por la proteína celular TRIM5 α , que es específica de especie. Por tanto, para infectar una especie determinada cada retrovirus debe generar variantes en las proteínas de la cápside que le permitan eludir el TRIM5 α específico, como el VIH ha realizado a lo largo de su evolución. El proceso de síntesis de ADN a partir del ARN viral o retrotranscripción es realizado por el complejo enzimático de la transcriptasa inversa. Una vez sintetizado, el ADN proviral se acopla a una serie de factores celulares y virales (Vpr) formando el complejo de preintegración. Este complejo es transportado al núcleo, donde se integra en el genoma del hospedador, constituyendo la forma proviral del VIH. El ADN no integrado representa el 90 % del ADN viral existente en linfocitos circulantes y en su forma lineal constituye un reservorio susceptible de integración si la célula es adecuadamente activada. Debido a su



corta semivida, la persistencia de ADN no integrado constituye un marcador de replicación viral en pacientes en tratamiento antirretroviral (TARGA), aunque éstos no presenten carga viral plasmática detectable.⁽⁴⁰⁾

Etapas tardías. Reactivación y replicación viral

A partir del estado de integración, el VIH puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada. A partir del estado de provirus integrado, la replicación del VIH comienza mediante la transcripción del genoma viral. La parte inicial de este proceso, denominada iniciación de la transcripción, depende de factores celulares y se produce en ausencia de proteínas virales. El principal factor celular que interviene en el paso de la fase de latencia viral a la de reactivación es NF- κ B, una familia de proteínas que regulan la expresión de múltiples genes celulares que participan en los procesos de reconocimiento y activación inmunitarios. Este factor no existe en forma activa en los linfocitos CD4 en estado de reposo y es inducido en el curso de los procesos de activación inmunológica, lo que explica que la replicación del VIH está estrechamente relacionada con el estado de activación de los linfocitos infectados.⁽⁴⁰⁾

Elongación y síntesis de ARN y proteínas

Una vez iniciada la síntesis del ARN viral, la expresión de la proteína viral Tat aumenta la tasa de transcripción del genoma del VIH y permite la elongación completa del ARN viral. El ARNm del VIH se sintetiza en forma de un único transcrito que debe ser transportado al citosol y procesado en ARNs de distintos tamaños. Procesamiento y transporte, son regulados por la proteína viral Rev, que tiene una localización preferentemente nuclear. Rev también participa en el acoplamiento de los distintos ARNm a la «maquinaria» de los ribosomas que sintetizarán las proteínas virales. Una vez sintetizadas, las proteínas virales deben ser procesadas antes de ensamblarse en lo que constituirán las partículas maduras. En este proceso participan proteínas del virus como Vif, Vpu y la proteasa viral. Vif aumenta entre 100 y 1.000 veces la infectividad viral. El mecanismo de acción de Vif se produce impidiendo la incorporación de la proteína celular APOBEC3G a viriones maduros. Esta proteína representa un mecanismo de inmunidad antiviral innata, activo frente a todos los retrovirus. Su acción sobre el VIH no se produce en la célula infectada, sino interfiriendo en el proceso de retrotranscripción en las células que serán infectadas en el siguiente ciclo. La



maduración final de los viriones y el ensamblaje correcto de las proteínas virales se produce durante el proceso de gemación a través de la membrana celular mediante la acción de la proteasa viral que procesa las poliproteínas gag y gag-pol y permite formar partículas virales maduras. Una vez que se produce la gemación de los viriones, éstos son liberados al espacio extracelular gracias al bloqueo de una proteína de membrana, la tetherina que actúa como un «secuestrador» de viriones en la membrana celular. La proteína Vpu del VIH-1 disminuye la expresión de los niveles de tetherina en la superficie celular permitiendo así la liberación de los viriones al medio extracelular. Este es el mecanismo por el que la presencia de la proteína Vpu aumenta la infectividad viral respecto a una variante viral que carece de dicha proteína.⁽⁴⁰⁾

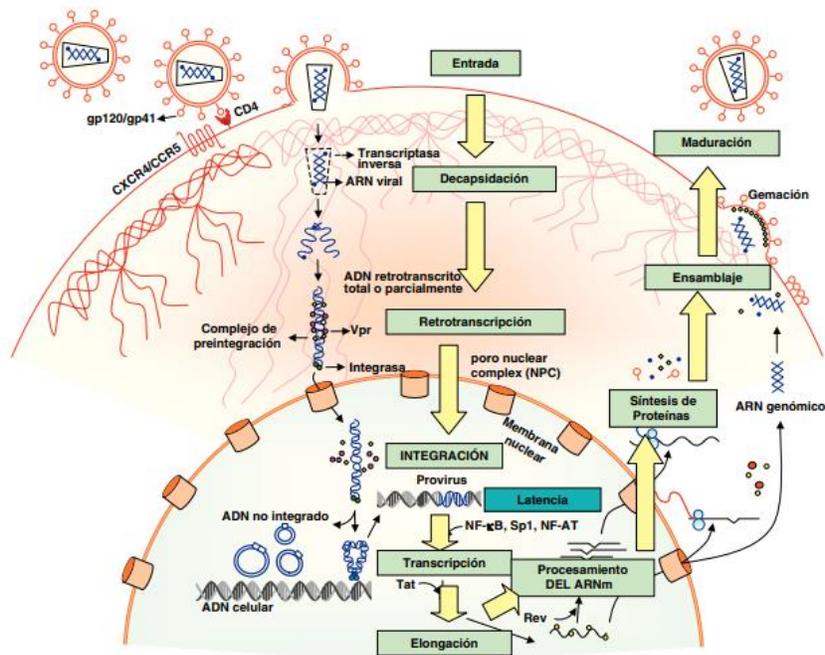


Figura 3. Ciclo biológico del VIH-1.

Fuente: ⁽⁴⁰⁾

II.6. Receptores, correceptores de entrada y clasificación fenotípica del VIH-1.

El receptor que utiliza el VIH para su entrada a la célula es la molécula CD4, que tiene 55kDa y se localiza, principalmente, en la membrana citoplasmática de los linfocitos T, los macrófagos, los monocitos, la microglia, las células de Langerhans y las células de la



mucosa rectal. Los llamados correceptores de entrada son las moléculas CCR5 y CXCR4, que también se encuentran en la superficie de los linfocitos y los macrófagos, y que, de manera natural, constituyen receptores de quimiocinas. Los ligandos naturales del CCR5 son las quimiocinas RANTES, MIP 1 α y MIP 1 β . El único ligando natural de CXCR4 es el SDF-1. También pueden actuar como correceptores del VIH-1 otras moléculas que son menos eficientes: CCR3, CCR2b, CCR8 y CCR9.^(29, 41)

La clasificación fenotípica del VIH se basa en sus propiedades replicativas, citopáticas y de tropismo. Desde el punto de vista replicativo la mayoría de los aislamientos de VIH-1 que se realizan a partir de muestras de pacientes con pocos años de infección, se caracterizan por una replicación viral lenta y se generan pocas cantidades de partículas. A este tipo de virus se le conoce como “slow/low” y se distingue del que se denominan “rapid/high” que exhibe una cinética de replicación rápida y genera gran cantidad de viriones con títulos altos.⁽⁴²⁾

De acuerdo al efecto citopático los virus se clasifican en inductores (IS) y no inductores de sincitios (NIS) cuando producen, o no producen este tipo de efecto después de cocultivar, primariamente, células mononucleares de sangre periférica (CMSP) infectadas con el virus, con la línea celular de origen linfoide MT-2.⁽⁴³⁾

Refiriéndose al tropismo, el VIH se clasifica por el uso de correceptores de quimiocina de la cepa viral predominante. Se observa una vinculación fuerte entre las cepas IS y los virus T-trópicos que infectan las células de la línea MT-2, mientras que los virus M-trópicos, que infectan macrófagos, generalmente no producen sincitios. El descubrimiento del uso de los correceptores por el VIH-1 llevó a un nuevo criterio de clasificación.⁽²⁹⁾

Los aislamientos que utilizan el correceptor CXCR4 se designaron como X4 y son con mucha frecuencia cepas T-trópicas, inductoras de sincitios; mientras que los que usan el correceptor CCR5, nombrados R5, son predominantemente cepas M-trópicas y no inductoras de sincitios. Aquellos virus que son capaces de infectar tanto macrófagos como células T se denominan duales (X4/R5) y expresan en sentido general un fenotipo casi idéntico al X4.^(29, 44, 45)



II.7. Historia natural de la enfermedad

El curso natural de la infección por VIH-1 se caracteriza por tres etapas o fases fundamentales: la infección aguda, la etapa de latencia clínica y la fase de sida. La infección aguda se produce inmediatamente después del contagio y se define como el periodo que transcurre desde la infección inicial hasta que se desarrollan anticuerpos contra el virus, que habitualmente tiene una duración desde seis semanas hasta tres meses.⁽⁴⁶⁾ Los síntomas y signos se pueden confundir con los de una mononucleosis infecciosa o una gripe, y aparecen en los días posteriores a la exposición. Los más comunes son: mialgias, artralgias, malestar general, fiebre, linfadenopatía, úlceras orales, pérdida de peso, meningitis aséptica, faringitis y erupción maculopapular cutánea. La viremia suele ser alta y se observa una disminución de los linfocitos T CD4+, que se recuperan, posteriormente, sin alcanzar los valores previos a la infección (Figura 4).^(46, 47)

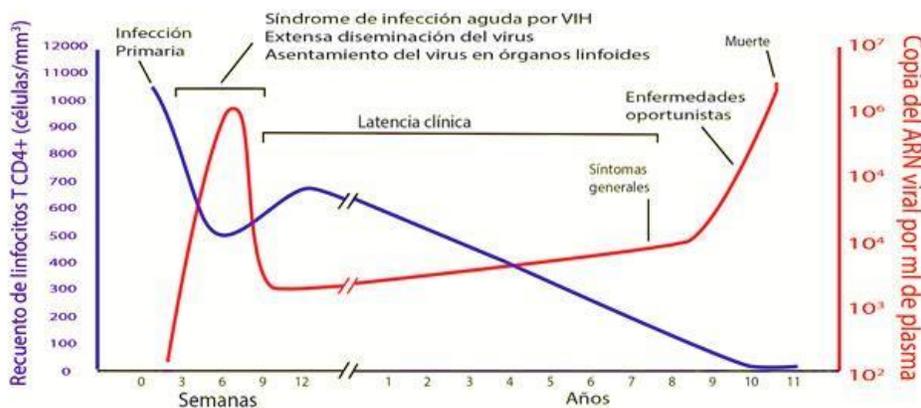


Figura 4. Fases de evolución del VIH/sida según los marcadores de progresión (número de linfocitos T CD4+ y carga viral).

Fuente: Hiv-timecourse.png./Dra. García Mónica Epidemiología molecular de enfermedades infecciosas, cuantificación de carga viral.

Al finalizar la fase de infección aguda, frecuentemente se equilibran los niveles de replicación viral y la respuesta inmune del huésped, y en muchos individuos no se presentan manifestaciones clínicas durante años. Esta etapa se conoce como “latencia clínica”, la cual suele tener una duración de 8 a 10 años e incluso más.⁽²⁹⁾ Durante esta etapa existe baja producción de virus, principalmente a nivel de los nódulos linfáticos, la carga viral es baja o



indetectable y se mantiene un equilibrio entre la producción de nuevos linfocitos T CD4+ y la destrucción constante otras células T CD4+ producto de la replicación viral y de otros mecanismos inmunológicos. ⁽⁴⁸⁾ Después de la etapa de latencia clínica, el conteo de los linfocitos T CD4+ disminuye lentamente hasta descender por debajo de las 200 células/mm³. Para este momento el sistema inmune ya no es capaz de controlar la replicación del VIH, por lo que la carga viral se eleva. ^(46, 49) Esta etapa es la conocida como fase sida, y se acompaña de síntomas y signos caracterizados por desórdenes inmunológicos, dermatológicos, hematológicos y neurológicos. También suele presentarse fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna y diarreas. Se incrementa el riesgo de desarrollar una serie de enfermedades oportunistas características de esta etapa que se conocen como enfermedades marcadoras de sida ^(46, 49, 50)

Tras la primoinfección existen diferentes patrones de evolución a sida. Aproximadamente el 10 % de los pacientes infectados por VIH progresan a sida en los dos o tres primeros años de la infección (progresores rápidos). Entre un 5 % y un 10 % permanecerán asintomáticos a los 10 o 15 años de la infección, y mantendrán una cifra de linfocitos CD4 por encima de 500/mm³ (enfermos no progresores a largo plazo), los restantes pacientes habrán desarrollado el sida a los 10 años (progresores típicos) ⁽⁵¹⁾.

Los factores relacionados con el huésped y los relacionados con el virus (la progresión a sida es un proceso multifactorial) determinan principalmente si una persona infectada habrá de desarrollar rápidamente la inmunodeficiencia clínicamente franca, o si esta persona pertenece al grupo de los no progresores a largo plazo, que representan aproximadamente el cinco por ciento del total de los pacientes infectados ⁽⁵¹⁾.

II.8. Marcadores de la progresión de la enfermedad

El conteo de LT CD4+ es un marcador excelente del estado inmunológico del paciente y determina el riesgo inmediato de infecciones oportunistas y otras complicaciones relacionadas con la enfermedad. ⁽⁵²⁾ La carga viral (CV) es un marcador con valor pronóstico, no solo predice la progresión hacia la enfermedad, independiente del conteo de LT CD4+, sino también la trayectoria del conteo de LT CD4+. Por otro lado, la CV es el marcador más útil para evaluar la respuesta al tratamiento ARV y la posible emergencia de resistencia ⁽⁵³⁾.



II.9. Variabilidad genética del VIH-1. Clasificación genotípica.

Una característica clave de la pandemia del VIH es su extraordinaria diversidad genética global.⁽⁵⁴⁾ La divergencia genética entre los subtipos del VIH-1 es de alrededor del 17-35 % a nivel de aminoácidos, dependiendo de los subtipos y las regiones del genoma considerados ⁽⁵⁵⁾.

Los análisis filogenéticos, basados principalmente de los genes *gag* (grupo antígeno específico) y *env* (envoltura), revelaron cuatro grandes grupos dentro del VIH-1 ⁽⁵⁶⁾: grupo M (Principal, del inglés *Main*), grupo O (Externo, del inglés *Outlier*), grupo N (no M, no O del inglés *non M, non O*) y el grupo P (del inglés, *Pending*) ⁽⁵⁷⁾ (Figura 5). Sin embargo, los virus del grupo M, debido a su amplia diseminación mundial, se convierten en los responsables de la actual pandemia. Este grupo se divide en nueve subtipos genéticos (A al D; F al H; J y K) ^(58, 59) y en múltiples formas recombinantes (FRs) que a su vez se clasifican en FRs circulantes (CRFs, del inglés, *circulating recombinant forms*) y FRs únicas (URFs, del inglés, *unique recombinant forms*) ⁽⁸⁾. En los subtipos A y F se distinguen sub-subtipos designados como A1, A2, A3, A4 y F1, F2, respectivamente.^(58, 60)

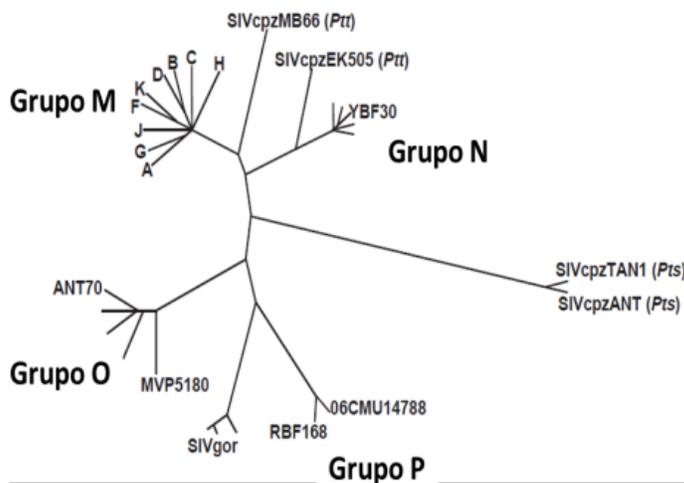


Figura 5. Clasificación genotípica del VIH-1.

Fuente:⁽²⁹⁾



La variabilidad genética del VIH-1 surge debido a la enzima transcriptasa inversa propensa a errores, lo que conduce a altas tasas de mutación y recombinación. Un prerrequisito para la recombinación es que un individuo esté coinfectado con dos o más cepas diferentes del VIH ⁽⁶¹⁾. Los recombinantes entre subtipos se designan como formas recombinantes circulantes (CRF) o formas recombinantes únicas (URF) ⁽⁵⁶⁾. Las CRF se definen como genomas recombinantes del VIH-1 que se identifican en tres o más individuos epidemiológicamente no relacionados. Las URF se refieren a secuencias recombinantes únicas sin evidencia de transmisión posterior. Los CRF pueden sufrir una mayor recombinación con otros subtipos puros o recombinantes, lo que da lugar a recombinantes secundarios, lo que conduce a una gama cada vez más compleja de recombinantes ⁽⁶²⁾.

Los estudios epidemiológicos moleculares globales han demostrado que la diversidad genética del VIH-1 es extremadamente compleja y está evolucionando ^(63, 64). La propagación y evolución global del VIH-1 ha provocado distribuciones globales diferenciales de subtipos, CRF y URF del VIH-1, lo que lleva a una gran variación regional en números, tipos y proporciones de variantes genéticas del VIH-1.

Los diversos patrones de distribución de las variantes del VIH están determinados por factores complejos, incluidas las redes de transmisión social, la urbanización, las redes de transporte, la migración, los efectos fundadores y el crecimiento de la población. También puede ser que diferentes variantes del VIH puedan tener una ventaja evolutiva en términos de transmisión y patogénesis ⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾. El aumento de la diversidad genética global del VIH-1 constituye claramente un obstáculo importante para el desarrollo de una vacuna globalmente eficaz contra el VIH-1 ⁽⁶⁸⁾. También afecta el diseño de ensayos de diagnóstico, resistencia y carga viral. Finalmente, la variabilidad y la rápida evolución del VIH-1 proporcionan los medios para examinar las relaciones evolutivas y los orígenes de las cepas (filogenética), la dinámica de crecimiento de las redes de transmisión (filodinámica) y para rastrear la propagación geográfica del VIH-1 (filogeografía) ^(62, 69)

La transmisión intercontinental del VIH-1 entre países con una relación socioeconómica cercana es eficiente para impulsar la diseminación de nuevos recombinantes. ⁽⁵⁴⁾ La diversidad genética del VIH debe estudiarse no sólo para discernir su origen y comprender



su epidemiología molecular, sino también para monitorear la aparición de nuevas variantes que pueden ser más transmisibles o patógenas, así como sus implicaciones para el diagnóstico de laboratorio serológico y molecular, y los cambios en los patrones de resistencia a los medicamentos antirretrovirales y al desarrollo de una vacuna eficaz. (35, 70)

La caracterización genética temprana del VIH-1 en Cuba demostró la circulación de varias variantes virales: subtipos A, B, C, D, F, G y H del grupo M. Posteriormente, se ha observado un aumento gradual en la diversidad, con el surgimiento de nuevos subtipos y formas recombinantes causadas por una mezcla de subtipos que originalmente contribuyeron a la epidemia en Cuba. (70, 71)

En Cuba, la diversidad ciertamente ha aumentado. Los primeros estudios se centraron en el gen de la envoltura (*env*), ya que es el más importante para la respuesta inmune y los estudios de vacunas; posteriormente, se estudiaron los genes *gag* y *pol*, revelando la circulación de otros subtipos y CRF. No fue hasta 2001 que comenzó la discusión sobre el mosaicismo del VIH en Cuba.⁽⁷²⁾ Investigaciones posteriores encontraron varias formas complejas y un aumento de CRF en la población seropositiva.^(70, 71)

II.10. Epidemiología

A 40 años del inicio de la epidemia por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), es importante examinar la evolución epidemiológica mundial, regional y nacional. Durante la última década, se han producido cambios epidemiológicos significativos, que están relacionados con diversos factores, entre los que destacan particularmente los avances en la terapia antirretroviral (TAR). El más importante ha sido el acceso acelerado al tratamiento universal, especialmente en las regiones más afectadas por la epidemia.

Otros elementos relevantes han sido la introducción de tratamientos en forma de tabletas únicas, nuevas moléculas y, más recientemente, medicamentos inyectables de acción prolongada, que en suma han demostrado una alta eficacia, incluso en pacientes con un historial de resistencia acumulada y con perfiles de seguridad muy favorables, lo cual ha contribuido a mejorar la adherencia de los pacientes. Paralelamente, se han logrado progresos notables en la prevención de la infección por VIH. Se ha demostrado que el uso de TAR funciona como una herramienta de prevención colectiva eficaz cuando las personas



viviendo con VIH (PVVIH) se mantienen con supresión virológica ⁽⁷³⁻⁷⁶⁾. También se ha promovido la implementación universal de la profilaxis pre exposición (PrEP), como parte de la estrategia de prevención combinada impulsada por la OMS. La evidencia acumulada en las últimas dos décadas ha hecho surgir un concepto fundamental: el fin de la epidemia es un objetivo alcanzable. En esta línea, la OMS ha establecido las metas 95-95-95 para el año 2030: lograr el diagnóstico de 95 % de las PVVIH, que 95 % de ellos tenga acceso a TAR y que 95 % de los usuarios de TAR logre supresión virológica ⁽⁷⁷⁾.

II.10.1. Situación epidemiológica mundial

Desde el inicio de la epidemia, 88.4 millones de personas han contraído la infección por VIH, y 42.3 millones de ellas han muerto de complicaciones relacionadas con el sida. La incidencia global de VIH ha disminuido lentamente pese a los grandes avances en las estrategias de prevención en la transmisión del VIH. Las nuevas infecciones se han reducido en un 60 % desde el pico máximo en 1996 y un 39 % desde 2010. ONUSIDA estimó que en 2023 aproximadamente 39,9 millones de personas vivían con VIH/sida en todo el mundo, de las cuales 2,3 millones residían en América Latina. El acceso a TAR ha aumentado progresivamente en el tiempo y para fines del 2023 el 77 % (30.7 millones) de las PVVIH en todo el mundo y 74 % en Latinoamérica estaban con TAR. Como resultado de lo anterior, las muertes relacionadas con la infección han disminuido 51 % desde 2010 y más de 69 % desde 2004, evitándose unos 20 millones de muertes en las últimas dos décadas⁽²⁾.

II.10.2. Situación epidemiológica en Cuba

Para el año 2023 había en Cuba 32 758 PVVIH, de las cuales 80.4 % eran hombres, dentro de los masculinos predominaban los hombres que tienen sexo con otros hombres (89,9 %). Con una prevalencia estimada de 0,38 % en personas de 15 a 49 y un total de 8421 fallecidos. La Vice dirección de Higiene y Epidemiología del MINSAP, en su balance anual del año 2023, reportó que 79.7 % de las PVVIH conocían su diagnóstico; de ese grupo, 97.5 % están en TAR y se alcanza la supresión virológica en 88.9%. En cuanto a la distribución geográfica por provincias la prevalencia más alta se encuentra en La Habana (0,79 %), Santiago de Cuba (0,43 %) y el municipio especial Isla de la Juventud (0,39 %).



II.11. Terapia antirretroviral

La mortalidad relacionada con el sida ha disminuido drásticamente y el este se ha convertido gradualmente en una enfermedad crónica controlable gracias a una terapia antirretroviral sumamente eficaz.⁽⁷⁸⁾

Los medicamentos antirretrovirales actúan interfiriendo en los procesos vitales de replicación viral y se clasifican según el paso que inhiben en el ciclo de vida viral (Figura 6). Un hito en la historia de la enfermedad por VIH ha sido la disponibilidad de nuevas clases de medicamentos, en 1995-96, lo que permitió la introducción de la terapia antirretroviral combinada (TARGA) y la evolución gradual de la infección por VIH hacia una enfermedad crónica, generalmente no mortal ^(79, 80). Entre ellas están los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos, inhibidores de la proteasa, los inhibidores de la cápside, inhibidores de la integrasa y los inhibidores de la entrada; que incluyen inhibidores de fusión (IF), antagonistas de los correceptores, inhibidores de la fijación y de la post-fijación.

La combinación más frecuentemente usada en el tratamiento de los pacientes consiste en la combinación de al menos, tres medicamentos que pertenezcan a dos familias de ARVs diferentes ⁽¹⁵⁾. La mayoría de las terapias combinadas incluyen dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósido o inhibidor de la proteasa. Además, se utilizan combinaciones de inhibidores de la integrasa o de la entrada con inhibidores de la RT e IPR como estrategia de tratamiento alternativa.^(80, 81)

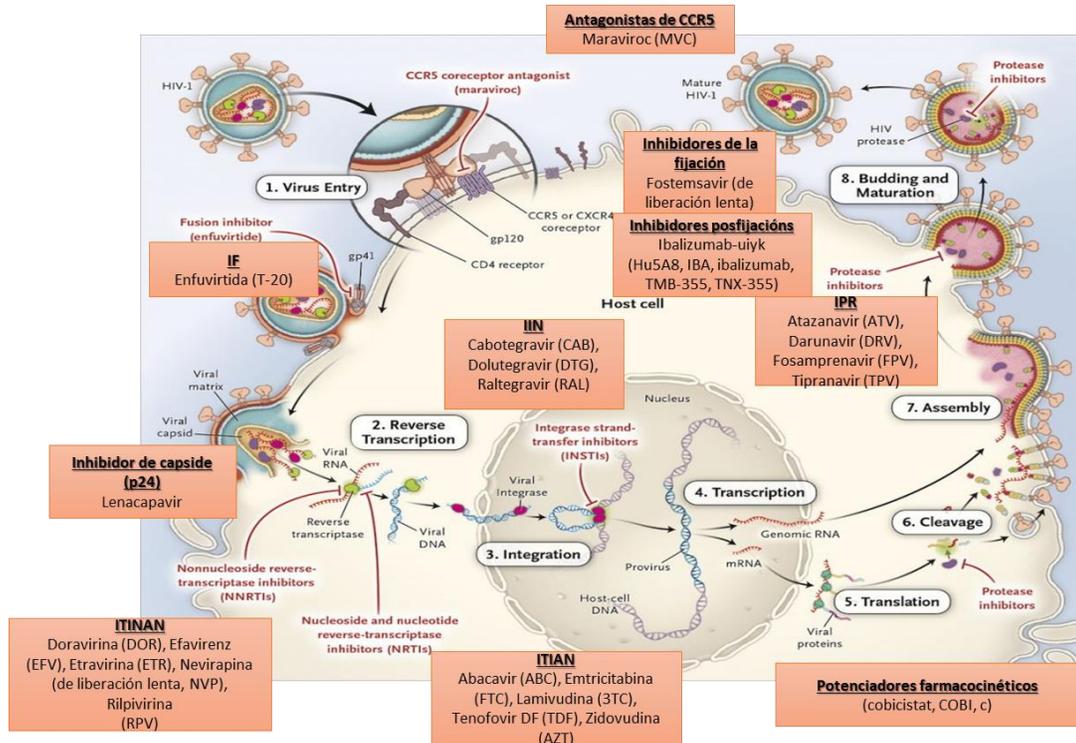


Figura 6. Ciclo de multiplicación viral y antivirales que actúan en cada paso del ciclo.

Fuente: Gandhi M, Gandhi RT. N Engl J Med 2014;371:248-259

II.12. Resistencia viral a la terapia.

Aunque los fármacos anti-VIH actuales y las estrategias de tratamiento mantienen la carga viral suprimida y a los pacientes relativamente sanos, el desarrollo de resistencia a los fármacos del VIH reduce o incluso elimina la eficacia del tratamiento antirretroviral. El VIH-1 posee una alta tasa de mutación y una alta frecuencia de recombinación, lo que podría dar lugar a la rápida aparición de variantes resistentes a los fármacos cuando la replicación viral no se inhibe lo suficiente ⁽⁷⁹⁾

Las mutaciones que confieren resistencia ocurren en los genes que codifican para las enzimas que son blancos de la terapia. La resistencia puede ser adquirida a través de la presión ejercida por la droga (resistencia adquirida) o transmitida de una persona a otra (resistencia transmitida). Los virus resistentes de manera natural son escasos la mayoría de los cambios aa que confieren resistencia son no polimórficos, por lo que raramente se encuentran en pacientes no tratados ⁽⁸²⁾. Dado que muchos de los fármacos antirretrovirales



pertenece a la misma clase, si el VIH se vuelve resistente a un fármaco de una clase, puede presentar distintos grados de resistencia a otros fármacos de la misma familia. Esto se denomina resistencia cruzada y puede limitar las futuras opciones de tratamiento. La resistencia cruzada pone de relieve la necesidad de nuevas terapias eficaces.⁽⁷⁸⁾

II.12.1. Resistencia a los Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos

Los ITIANs constituyen la columna vertebral de la mayoría de los regímenes de terapia antirretroviral (TAR) de primera y segunda línea formulados para el tratamiento de la infección por VIH-1.⁽⁷⁸⁾

Existen dos mecanismos de resistencia asociados a los ITIANs: (I) mutaciones discriminatorias que permiten a la TI diferenciar entre el dideoxi-sintético y el natural, evitando la incorporación del ITIANs a la cadena de ADN viral que se está formando y (II) el denominado pirofosfolisis. En este último, las mutaciones que se desarrollan permiten la eliminación del trifosfato sintético que ha sido adicionado a la cadena de ADN viral en formación. Las mutaciones que desencadenan este mecanismo, también, se conocen como mutaciones asociadas a los análogos de timidina (TAMs); porque se presenta en pacientes tratados con estos compuestos, como el AZT⁽⁸²⁾

Dos mutaciones poco frecuentes, están asociadas con altos niveles de resistencia cruzada a los ITIANs: la inserción de dos aminoácidos en el codón 69 (T69ins), y la Q151M. La inserción 69 ocurre exclusivamente en combinación con múltiples TAMs y en este contexto causa altos niveles de resistencia a todos los ITIANs⁽⁸²⁾.

II.12.2. Resistencia a los Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleosides

Los ITINANs inhiben alostéricamente la TI del VIH-1 por unión a un bolsillo hidrofóbico cercano al sitio activo de la TI. Casi todas las mutaciones de resistencia ITINAN están dentro o adyacentes a este bolsillo. Los ITINANs tienen baja barrera genética de resistencia. Los altos niveles de resistencia a la NVP generalmente requieren de una sola mutación, el EFV de una o dos mutaciones, y la ETR, de dos. Entre los no análogos existe un alto nivel de resistencia cruzada, resultado de dos mecanismos: (I) la mayoría de las mutaciones de



resistencia ITINAN reducen la susceptibilidad a dos o más ITINANs; y (II) la baja barrera genética de la resistencia ITINAN hace que emerjan *in vivo* múltiples linajes virales resistentes independientes, aun cuando ellas puedan no ser detectadas por los ensayos de resistencia ⁽⁸³⁾.

II.12.3. Resistencia a los Inhibidores de la proteasa

Los IPR compiten por el centro activo de la proteasa del VIH-1 e impiden que la enzima lleve a cabo el procesamiento de las poliproteínas de Gag y Gag /pol, necesarios para la maduración viral. Hay tres IPR en uso actualmente, solo el ritonavir (RTV) es usado para potenciar los niveles de los otros IPR. Existen múltiples mutaciones de resistencia a los IPR. Las mutaciones principales de resistencia a los IPR, por sí mismas, reducen la susceptibilidad a uno o más IPR. Las mutaciones accesorias compensan la capacidad replicativa disminuida producto de las mutaciones principales y, además, reducen la susceptibilidad a los IPR en combinación con uno o más de estas mutaciones. Las conocidas como principales son D30N, V32I, M46IL, G48VM, I50VL, I54VTALM, L76V, V82ATFS, I84V, N88S y L90M. Todas ellas son notables por causar altos niveles de resistencia a un IPR ⁽⁸²⁾.

II.12.4. Resistencia a los antagonistas de los correceptores (CCR5)

Se proponen los siguientes mecanismos de resistencia: 1) cambio de tropismo (utilización de CXCR4 en lugar de CCR5 para la entrada), 2) aumento de afinidad por el correceptor CCR5, 3) utilización del correceptor aun en presencia de su agonista natural, y 4) incremento en la entrada de virus a la célula ⁽⁸⁴⁾. La causa más común para el fallo de la terapia con antagonistas de los correceptores es la emergencia de variantes virales minoritarias que utilicen el receptor CXCR4. La mayoría de las mutaciones se presentan en la región del bucle V3 y en las regiones V2, C3, y V4 de la gp120, así como también en la gp41⁽⁸⁵⁾. Se conocen un grupo de mutaciones presentes en CCR5 que afectan ligeramente la capacidad de CCR5 de unirse a su ligando o la del virus para utilizar esta molécula como correceptor ⁽⁸⁶⁾. Se describe que mutaciones en la posición 13 del bucle V3 -como reemplazos de prolina o treonina por histidina- juegan un papel importante en la resistencia a MVC. Algunos estudios señalan que la resistencia puede ocasionarse por mutaciones ubicadas fuera del



bucle V3. Sin embargo, otros estudios plantean que las mutaciones en V3 por sí solas son capaces de conferir una resistencia completa. Los cambios en V3 ocurren fundamentalmente entre las posiciones 11 y 26. Se observan inserciones entre las posiciones 15 y 16, 24 y 25 y deleciones en la posición 18. En general, el perfil de resistencia a Maraviroc es complejo y los datos disponibles se corresponden con un número reducido de pacientes de los ensayos clínicos realizados ⁽⁸⁷⁾.

II.12.5. Resistencia a los inhibidores de la integrasa

La resistencia del VIH a los inhibidores de la integrasa es de tipo competitiva y se desarrolla mediante mutaciones en el centro activo de la IN que interrumpen las interacciones de la enzima con el ARV ⁽⁸⁸⁾. En los estudios in vitro se identificaron más de 69 mutaciones asociadas a resistencia dentro de la región de la integrasa. En los ensayos clínicos BENCHMRK ⁽⁸⁹⁾, así como en la experiencia clínica hasta la fecha, se encontraron principalmente tres patrones de resistencia independientes, caracterizados por la selección de una mutación primaria normalmente acompañada de algunas secundarias o compensatorias: la N155H + L74M, E92Q, T97A, V151I, G163R; la Q148K/R/H + G140S/A, E138K y la Y143R/C + L74A/I, T97A, I203M, S230R ⁽⁹⁰⁾. Existe resistencia cruzada entre los inhibidores de la integrasa. Debido a la escasa experiencia clínica que todavía se tiene, no está clara la influencia que pueda ejercer cada una de las mutaciones sobre la susceptibilidad. Sin embargo, se identificaron las siguientes combinaciones de las mutaciones que confieren resistencia cruzada: E92Q + N155H, T66A; N155H + T66I y Q148R/H/K + E138K, G140C/S, S147G ⁽⁹¹⁾. Los estudios VIKING y SAILOR identificaron otras mutaciones que se asocian con la resistencia al dolutegravir (DTG) b y que limitan la eficacia de la terapia: R263K, V151V/I, R263K, E138A/T, Y143H y E157E/Q ⁽⁹²⁾.

II.13. Ensayos de laboratorio para la determinación de la resistencia del VIH-1 frente a los antirretrovirales

Existen dos grandes grupos de técnicas para la detección de resistencia del VIH-1 al tratamiento antirretroviral: las fenotípicas y las genotípicas. Las pruebas fenotípicas consisten en un sistema de replicación in vitro donde se enfrenta el virus con diferentes concentraciones de los fármacos antirretrovirales. El grado de inhibición del crecimiento se



establece por comparación con una cepa de referencia ⁽⁹³⁾. Las pruebas de resistencia genotípica detectan mutaciones de resistencia a la droga en las enzimas que son blancos de la terapia antiviral: proteasa (PR), TI, integrasa (INT), la gp41 y la gp 120.

Usualmente las pruebas genotípicas son empleadas más frecuentemente que las fenotípicas porque cuestan menos, requieren menos tiempo y son superiores en detectar la resistencia desarrollada ⁽⁹³⁾.

II.13.1. Ensayos de resistencia genotípica

Las pruebas genotípicas se basan en el análisis del genoma y por tanto detectan la presencia de mutaciones⁽⁹³⁾.

II.13.1.1. Secuenciación de 1ª generación (Sanger)

La historia de la secuenciación del ADN se remonta a 1977, año en el que, Maxam-Gilbert y Sanger-Coulson describieron, de forma independiente, dos estrategias que permitían obtener secuencias de cientos de nucleótidos en solo unas horas^(94, 95). No obstante, la complejidad experimental y difícil automatización del método basado en la escisión química diferencial propuesto por Maxam y Gilbert ha hecho que éste haya quedado en desuso en la actualidad. El método propuesto por Sanger-Coulson, o de terminación de la cadena, se basa en la síntesis secuencial de una hebra de ADN complementaria a la hebra de cadena simple cuya secuencia quiere determinarse, residiendo la clave del método en la adición de dideoxinucleótidos o nucleótidos de parada a la mezcla de la reacción ya que, al carecer estos nucleótidos del grupo 3'-OH, su adición resulta en la interrupción de la síntesis. Así, la secuenciación de Sanger-Coulson consiste en llevar a cabo 4 reacciones independientes conteniendo cada una de las mezclas de reacción la hebra molde, la ADN polimerasa, un cebador marcado, los cuatro 2'-deoxinucleótidos (dNTP) y uno de los cuatro dideoxinucleótidos (ddNTP) en menor proporción. Finalizado el proceso de síntesis, la adición aleatoria de estos nucleótidos de parada resulta en la obtención de 4 mezclas de fragmentos de diferente tamaño interrumpidos por el ddNTP correspondiente que, al ser separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, permiten elucidar la secuencia de nucleótidos de la cadena de ADN molde gracias al marcaje incorporado al cebador ⁽⁹⁶⁾.



El método de terminación de cadena fue bien acogido en la comunidad científica y su uso se extendió casi de forma inmediata. Los avances tecnológicos que acontecieron en años posteriores hicieron que en 1987 saliera al mercado el primer secuenciador Sanger automatizado capaz de generar hasta 1000 pares de bases al día, cuya principal diferencia con el método descrito originalmente radicaba en la sustitución del marcaje radiactivo de los cebadores por el uso de ddNTPs marcados con 4 fluoróforos distintos lo que permitía realizar la secuenciación en una sola mezcla de reacción eliminando además la generación de residuos reactivos. Cabe destacar también, que estos secuenciadores sustituían la electroforesis en geles de poliacrilamida por la electroforesis capilar e incorporaban la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa descrita por Mullis en 1983. La automatización de la secuenciación Sanger supuso una revolución en el campo de la genética humana, actuando como catalizador de proyectos tan ambiciosos para la época como el Proyecto Genoma Humano; proyectos que, a su vez, han propiciado el desarrollo de nuevas generaciones de secuenciadores. No obstante, a pesar de la fuerte irrupción de estas nuevas generaciones de secuenciadores y de la necesidad de cierto conocimiento previo sobre la secuencia a resolver, los secuenciadores Sanger tuvieron y continúan teniendo un importante papel en numerosas investigaciones y aplicaciones microbiológicas. Así, por ejemplo, la secuenciación Sanger continúa siendo ampliamente utilizada para la identificación taxonómica de aislados microbiológicos mediante secuenciación del gen que codifica la subunidad menor del ARN ribosómico 16S ⁽⁹⁶⁾.

La secuencia de nucleótidos es entonces traducida a su secuencia de aminoácido. La secuencia de aminoácido estudiada es comparada con una secuencia consenso del subtipo B. Las diferencias entre la secuencia estudiada y el consenso generan un conjunto de mutaciones. Las mutaciones son 16 reportadas utilizando un patrón en el cual cada mutación es denotada por el código de una letra para el aminoácido de referencia de tipo salvaje, seguido por la posición del aminoácido, y por el código de una letra para el aminoácido mutado, que fue encontrado en la secuencia estudiada ⁽⁹³⁾.

La secuencia obtenida de cada virus es enviada a una base de datos que realiza una predicción de resistencia según las mutaciones que detecte. Este proceso es realizado por sistemas automatizados de interpretación de la resistencia genotípica, aplicados en los



laboratorios que llevan a cabo esta metodología. Hay alrededor de diez sistemas de interpretación comúnmente usados, del cual aproximadamente la mitad son privados y la otra mitad están disponibles en Internet. Asimismo, muchas mutaciones relacionadas con resistencia no causan resistencia por sí mismas, pero indican la presencia de la presión selectiva de la droga y sugiere que la población viral presente en el paciente está evolucionando hacia la resistencia ⁽⁹³⁾.

II.13.1.2. Secuenciación de 2ª generación (Masiva)

La secuenciación masiva engloba toda una generación de secuenciadores que utilizan diferentes tecnologías, estrategias y aproximaciones, cuya característica común es su habilidad para llevar a cabo de forma simultánea millones de reacciones de secuenciación en paralelo a un precio asequible y en un tiempo relativamente corto. Los secuenciadores masivos o de segunda generación difieren en muchos aspectos con los secuenciadores tipo Sanger. Una de las principales diferencias es la realización simultánea de millones de reacciones de secuenciación de fragmentos muy cortos que pueden asignarse a cada una de las muestras que se analizan simultáneamente gracias a la preparación previa de unas librerías etiquetadas que se inmovilizan sobre una matriz bidimensional⁽⁹⁷⁾.

De forma general, el proceso de secuenciación masiva puede dividirse en tres pasos: (1) preparación de librerías, (2) inmovilización sobre una superficie bidimensional y amplificación in vitro de la librería y (3) secuenciación y captación de señal⁽⁹⁷⁾.

La preparación de librerías consiste básicamente en fragmentar y marcar de forma inequívoca las diferentes muestras de ADN cuya secuencia quiere conocerse. Actualmente, existen diferentes estrategias de fragmentación del ADN (física, enzimática o química) cuyo objetivo final es la obtención de una mezcla de fragmentos de un tamaño homogéneo, estando el tamaño deseado determinado por la tecnología de secuenciación empleada. Una vez fragmentado el ADN genómico se procede al marcaje para lo cual se añaden unos identificadores únicos que no sólo permiten identificar la muestra a la que pertenecen, sino que además permiten la posterior fijación de los mismos a la superficie bidimensional donde tendrá lugar la reacción de secuenciación ⁽⁹⁷⁾.



Una vez preparadas las librerías, éstas se fijan a una superficie bidimensional donde son amplificadas in vitro existiendo también en este punto diferentes estrategias. De todas ellas, la más sencilla es la utilizada por los secuenciadores de Illumina y denominada amplificación puente (bridge amplification). En esta estrategia los cebadores necesarios para el inicio de la reacción de amplificación se encuentran inmovilizados sobre una superficie bidimensional; al ser estos cebadores complementarios a una parte de los identificadores incorporados en la preparación de librerías, las muestras quedan inmovilizadas y en disposición de iniciarse la amplificación clonal en paralelo de todas las muestras. Otras estrategias alternativas incluyen la amplificación en emulsión o la amplificación en nanobolas (rolling-circle amplification)⁽⁹⁷⁾.

Finalmente, una vez amplificados los fragmentos de ADN, se produce la reacción de secuenciación para la cual también se han desarrollado diferentes estrategias. Una de estas estrategias es la pirosecuenciación, cuya base es la utilización de nucleótidos cuya incorporación a la hebra complementaria en síntesis conlleva la liberación de pirofosfatos que, en última instancia generan luz que puede detectarse permitiendo así elucidar la secuencia de nucleótidos. Otra estrategia ampliamente utilizada es la denominada secuenciación por síntesis (SBS, sequencing by synthesis). En esta aproximación la reacción de síntesis consiste en la incorporación secuencial y reversible de nucleótidos marcados con fluoróforos distintos que impiden además la adición posterior de más nucleótidos; de esta forma, en cada paso se produce la adición de un único nucleótido a cada uno de los fragmentos en síntesis cuya señal fluorescente es captada y traducida a nucleótidos. Finalmente, otra aproximación ampliamente utilizada es la denominada secuenciación mediante ligación (SBL; sequencing by ligation) que no utiliza ADN polimerasas y cuya base reside en la utilización de una mezcla de sondas marcadas con fluoróforos que se unen mediante ligasas específicas. Por tanto, es importante conocer la estrategia química de secuenciación en que se basa el secuenciador ya que determina en gran medida sus características y prestaciones ⁽⁹⁷⁾.



Secuenciación por Ion Torrent

1. Preparación de la Muestra:

- Extracción del ADN: Se extrae el ADN/ARN de la muestra biológica.
- Fragmentación: El ADN se fragmenta en partes más pequeñas, generalmente mediante sonicación o enzimas.

2. Construcción de la librería: Se generan pequeños fragmentos de distinto tamaño y posteriormente se unen a sus extremos unas moléculas llamadas adaptadores. Estos adaptadores son secuencias cortas de ADN que permiten la amplificación y el posterior análisis de los fragmentos durante la secuenciación. En el caso de Ion Torrent, los adaptadores también facilitan la unión a las superficies de los chips donde se llevará a cabo la secuenciación. El conjunto de todos los fragmentos de ADN unidos a sus adaptadores se conoce como librería. Los fragmentos de ADN con adaptadores se amplifican, lo que aumenta la cantidad de ADN disponible para la secuenciación⁽⁹⁸⁾.

La biotina es una vitamina (B7) que se utiliza en biotecnología y biología molecular por sus propiedades de unión específicas. Durante la librería se utiliza para marcar fragmentos de ADN, lo que permite su detección y seguimiento en diferentes etapas del proceso experimental ⁽⁹⁸⁾.

3. Reacción en cadena de la polimerasa en emulsión:

En este proceso ocurre la amplificación de los fragmentos de ADN en una emulsión de aceite mineral y todos los reactivos del PCR (listos para su uso). Esta mezcla contiene partículas iónicas esféricas (ISP, del inglés, *ionic spheres particles*) a las cuales se unen las cadenas de ADN amplificadas. Dichas cadenas contendrán moléculas identificadoras, que permiten cotejar cada fragmento con su muestra de origen, y adaptadores homólogos a una región de las esferas. A partir de estas uniones se produce la amplificación exponencial de los fragmentos diana. En la etapa final del proceso se romperá la emulsión, y las partículas esféricas unidas a los fragmentos amplificados se adhieren a las paredes de los tubos de reacción mediante una centrifugación automatizada.



Tras la PCR en emulsión tendremos de nuevo tres tipos de micelas:

- Monoclonales: micelas que incluyen una única ISP que se encuentra asociada con millones de copias debido a la amplificación de un solo tipo de molécula de ADN.
- Policlonales: micelas que incluyen una única ISP con varias moléculas de ADN unidas. Cada tipo de molécula de ADN unida a la ISP presentará millones de copias.
- No clonales: micelas que incluyen varias ISP a las que no se han unido moléculas de ADN.

Las micelas de interés para la posterior secuenciación son las de tipo monoclonal, ya que incluirán millones de copias de un solo tipo de moléculas de ADN.

Enriquecimiento de las ISP

Tras la PCR en emulsión, hay que recuperar las ISP. El enriquecimiento de las ISP se realiza en el instrumento Ion One Touch™ES y se utilizan Dynabeads™ MyOne™Streptavidin C1, que son esferas magnéticas de 1 µm de diámetro, recubiertas de una monocapa de estreptavidina unida covalentemente a la superficie.

Las Dynabeads™ forman el complejo estreptavidina-biotina con el código de barras de las ISP monoclonales y policlonales. Dicho complejo resulta ser una de las interacciones no covalentes más fuertes que se conocen y es capaz de unirse a un imán del Ion OneTouch™ES, que permite el lavado de las ISP no clonales.

5. Secuenciación mediante semiconductores

La secuenciación en Ion Torrent se lleva a cabo en un chip semiconductor. La detección de las bases en la secuenciación se da por medio de la detección de un ion semiconductor ⁽⁹⁹⁾.

El instrumento utilizado para la secuenciación es el Ion Torrents PGM™, basado en la detección de protones liberados en el proceso de replicación de ADN. A partir de las ISP, que contienen el ADN amplificado de los pacientes, se añaden los oligonucleótidos de secuenciación, de secuencia complementaria al código de barras y al adaptador P1, para que posteriormente, el ADN polimerasa pueda actuar. Para la hibridación de los oligonucleótidos a las muestras, se ejecuta el siguiente programa en el termociclador: 95°C durante 2 min y 37°C durante 2 min. Cuando acaba el proceso de hibridación, se añade el ADN polimerasa de secuenciación y se procede a la carga del chip, que es el soporte físico donde se lleva a cabo la secuenciación. El chip usado para este trabajo es el Ion 316™ Chip



v2 BC, que arroja aproximadamente de 2 a 3 millones de lecturas, lo que es suficiente para secuenciar dos pacientes con cobertura adecuada. Dicho chip está formado por micropocillos, en los que se cargan las ISP. Tras la carga y el llenado del chip, éste se introduce en el Ion Torrent™ PGM™ y se realiza la reacción de secuenciación, que tiene una duración de 5 h ⁽¹⁰⁰⁾.

Cuando un nucleótido es ligado a la hebra que se va a secuenciar, se forma un enlace covalente y se libera un ion de hidrógeno cargado positivamente. Cada vez que se libera un ion de hidrógeno, se produce un cambio en el pH de la solución del pocillo y se genera una corriente eléctrica. Este método se basa en la detección del cambio de voltaje por medio un sensor llamado ISFET (Ion-Sensitive FieldEffect Transistor), que indica que el nucleótido se ha incorporado correctamente. Para la identificación del tipo de nucleótido agregado, inicialmente se inserta solo un tipo de base en el pocillo y el sensor ISFET detectará o no el voltaje dependiendo de la complementariedad de la base. Si esta no es complementaria, se agrega otro nucleótido hasta que se detecte voltaje. En esta técnica, los nucleótidos no están modificados con terminadores reversibles, por lo que en caso de que haya homopolímeros (dos o más nucleótidos iguales que se repiten), el pH disminuirá en mayor proporción y la diferencia de voltaje aumentará proporcionalmente al número de bases añadidas. Este proceso ocurre de forma paralela en todos los pocillos del chip y alcanza una longitud de lectura de hasta 400 pares de bases ⁽⁹⁹⁾.

Una vez acabada la secuenciación, las señales generadas son transmitidas directamente al ordenador, con el que se procede al análisis bioinformático.

6. Creación de archivos con información de la secuenciación y alineamiento de las lecturas contra un genoma de referencia.

Los cientos de miles de lecturas obtenidas son almacenadas en archivos fastq (dos por paciente). Se requieren el empleo de potentes herramientas informáticas para proceder al alineamiento de las secuencias, y posteriormente generar una base de datos con las variantes obtenidas ⁽⁹⁸⁾.

Las técnicas de secuenciación NGS generan principalmente, tres tipos de ficheros: FASTQ, SAM/BAM (alineamiento) y VCF (anotación). Fichero FASTQ: es un fichero de texto de



entrada estándar que contiene los datos crudos (lecturas) obtenidos por el secuenciador. Permite almacenar la secuencia biológica junto con las calidades asociadas a cada nucleótido de la secuencia. Este fichero es reconocido por las herramientas bioinformáticas encargadas del alineamiento. Fichero SAM (del inglés Sequence Alignment/Map format): representación de alineamientos de secuencias contra un genoma o secuencia de referencia. Fichero BAM (del inglés Binary Alignment/Map format): versión comprimida del formato SAM. Permite realizar un indexado para tener acceso directo a las posiciones genómicas. Los datos del alineamiento se visualizan empleando herramientas de visualización interactiva como IGV (del inglés Integrative Genomics Viewer). Fichero VCF (del inglés Variant Call Format) se obtiene a partir de los ficheros SAM/BAM. Permite almacenar las variaciones de la secuencia con respecto al genoma contra el que se alinea: SNPs, inserciones, deleciones y variantes estructurales, junto con ciertas anotaciones opcionales derivadas de diferentes bases de datos ⁽⁹⁸⁾.

Un aspecto importante en la NGS es el número de veces que cada base del genoma está presente en las lecturas de secuenciación producidas; es decir, el número de veces que se lee cada nucleótido. Este valor se denomina cobertura y es uno de los factores determinantes para evaluar la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición del genoma. El diseño de paneles de NGS debe garantizar una adecuada cobertura en todos los genes analizados. La gran capacidad de estas tecnologías para generar datos genómicos va a incrementar significativamente la información genética asociada que disponemos en la actualidad ⁽⁹⁸⁾.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Tipo de investigación, universo y muestra

III.1.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio comparativo para evaluar el desempeño analítico e implementar el método de secuenciación masiva o secuenciación de nueva generación, así como para la identificación de mutaciones virales, niveles de resistencia a los ARVs empleados en el tratamiento de la infección por VIH-1 y subtipos, en muestras de pacientes cubanos no tratados. Las muestras se recibieron en el laboratorio de Infecciones de Trasmisión Sexual (ITS) del Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) en el período de enero de 2022 a Julio de 2024.

III.1.2. Universo de estudio

El universo se constituyó por las muestras de plasma de pacientes seropositivos al VIH-1, no tratados, procedentes de todas las provincias de Cuba, a los cuales se les indicó la prueba genotípica por parte del médico de asistencia, durante el periodo de estudio.

III.1.3. Criterios de inclusión

- Muestras de plasma de pacientes seropositivos al VIH-1, no tratados durante el periodo de estudio, cuyas muestras hayan sido secuenciadas por el método de Sanger y de las que se obtuvieron secuencias de los genes que codifican para las enzimas PR-TI e INT.

III.1.4. Criterios de exclusión

- Muestras de plasma de pacientes de las que no se hayan podido obtener secuencia de los genes que codifican para las enzimas PR-TI e INT, por el método de Sanger en dicho periodo.



III.2. Operacionalización de las variables

Variables	Tipo	Escala	Descripción
Subtipo de VIH-1	Cualitativa nominal politómica	A, B, C, D, F, G, H, URFs, CRFs (CRF18_cpx, CRF19_cpx, CRFs_BG (20, 23 y 24)	Subtipo viral de VIH-1 identificado por ambos métodos de secuenciación, con el cual se encuentra infectado el paciente estudiado, luego de amplificados los genes virales <i>pol</i> y <i>env</i> .
Mutaciones de Resistencia y polimorfismos	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Presencia de mutaciones a ITIAN, ITINAN, IPR, IINT, identificadas por ambos métodos de secuenciación.
Niveles de resistencia a ITIAN, ITINAN, IPR, INT	Cualitativa nominal politómica	Alta Media Baja	Diferentes niveles de resistencia a los ARV, según las mutaciones detectadas por ambos métodos de secuenciación.
Sensibilidad	Cuantitativa continua	1-100	Proporción de mutaciones del VIH-1 en los genes que codifican para la PR-TI e INT (totales y MDR), los niveles de resistencia a los fármacos ARV, los subtipos y variantes virales, correctamente identificados por la prueba empleada. Se expresa como porcentaje de positividad real.
Especificidad	Cuantitativa continua	1-100	Proporción de muestras negativas para mutaciones del VIH-1 en los genes que codifican para la PR-TI e INT (totales y MDR), los niveles de resistencia a los fármacos ARV, los subtipos y variantes virales, correctamente identificadas por la prueba empleada. Se expresa como el porcentaje de negatividad real.



Concordancia	Cuantitativa continua	1-100	Se emplearán los resultados de todas las muestras analizadas en los estudios de sensibilidad y especificidad. Se expresa como porcentaje.
Índice Kappa (K)	Cuantitativa continua	Deficiente < 0,20 Regular 0,21-0,40 Moderada 0,41-0,60 Buena 0,61-0,80 Muy buena 0,81-1,00	Se basa en la comparación de índices de concordancia esperados y observados. Se expresa como un valor numérico absoluto entre 0 y 1.

Abreviaturas: **VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana; **URFs:** formas recombinantes únicas (del inglés, *unique recombinant forms*); **CRFs:** formas recombinantes circulantes (del inglés, *circulating recombinant forms*); **ITIAN:** inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; **ITINAN:** inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; **IP:** inhibidores de la proteasa; **IINT:** inhibidores de la integrasa; **ARV:** antirretrovirales; **PR-TI:** proteasa-transcriptasa reversa (TI, del inglés, *reverse transcriptase*); **INT:** integrasa; **MDR:** mutaciones asociadas con resistencia a droga; **DE:** desviación estándar.

III.3 Definiciones de términos

Mutaciones relacionadas con resistencia a drogas (MDR): Cambios en la estructura genética del VIH (mutaciones) que afectan la capacidad de los medicamentos para bloquear la replicación del virus y a las se les asigna un puntaje de penalización por el sistema de interpretación de HIVdb (HIVdb, disponible en: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CONSENSUS/Consensus.html>, consultada el 12 de agosto de 2024).

Polimorfismos: Son cambios de aminoácidos (aa) que no están asociados con la resistencia a los medicamentos y que se pueden observar usualmente en el fragmento del gen que codifica para las enzimas TI, PR e INT.



Mutaciones ambiguas: Cambios en la estructura genética del VIH en los que en una misma posición se pueden encontrar dos aa diferentes, también denominados mezclas, que afectan la capacidad de los medicamentos para bloquear la replicación del virus.

Mutaciones de APOBEC: Son cambios de G por A en la secuencia codificante del VIH-1 (fragmento del gen que codifica para las enzimas TI, PR e INT), relacionados con las proteínas APOBEC3. Estas enzimas son citidina deaminasas y se conoce que una elevada edición de G por A puede resultar en el fenómeno de mutagénesis letal, denominado hipermutación.

Mutaciones inusuales: Son cambios aa con una prevalencia <0,01 % en HIVdb y que no son una MDR conocida, ni una mutación distintiva de APOBEC. No se observan usualmente en el fragmento del gen que codifica para las enzimas TI, PR e INT

Secuencia completa: Está definida como la obtención completa del fragmento del gen que codifica para la proteína en cuestión (PR: del aa 1 al 99, TI: del aa 1 al 335, INT: del aa 1 al 288)

Concordancia completa: se define como la identificación de un cambio aa por ambos métodos de secuencia. Estas variaciones aa son definidas como diferencias de aminoácidos en la misma posición con respecto a la secuencia de aa consenso del subtipo B, según la base de datos del VIH (HIVdb, disponible en: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CONSENSUS/Consensus.html>, consultada el 12 de agosto de 2024). También puede definirse como la identificación de una mezcla de nucleótidos, en la que ambos métodos detectaron, al menos uno de los componentes de la mezcla.

Discordancia completa: se define como la identificación por ambos métodos de diferentes aminoácidos en la misma posición.

III.4 Técnicas y procedimientos

III.4.1 Secuenciación por el método de Sanger

III.4.1.1 Extracción del ARN viral

Se tomó 1mL de plasma por cada paciente y se centrifugó a 14.000 rpm (revoluciones por minuto) durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante se descartó hasta quedar 140 µL, con el que



se disolvió el sedimento con vórtex vigoroso por 15 segundos. Una vez disueltos, se utilizaron para la extracción manual del ARN viral, con el empleo del estuche comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Alemania), según las indicaciones del fabricante. El ARN extraído se conservó a -80°C hasta su utilización en los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*).

III.4.1.2. Síntesis del ADN complementario (ADNc) y amplificación

Se realizó la síntesis y amplificación de dos fragmentos de ADNc del gen *pol*, uno de 2.060 pares de base (pb); que codifica para la proteasa y transcriptasa inversa y otro de 2.102 pb; que codifica para la integrasa del VIH-1. Se utilizó el estuche comercial *Super Script™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity* (Invitrogen™, EE. UU), según las indicaciones del fabricante.

A continuación, se describen los componentes de las mezclas de reacción de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para la amplificación de ambos fragmentos. Las secuencias de los cebadores que fueron utilizados para este propósito se describen en el anexo 1.

Mezcla para la RT-PCR del fragmento de 2.060 pb (proteasa y transcriptasa inversa)

- 15 μL de tampón *2X Reaction Mix*, (0,4 mM de cada dNTP (Deoxinucleótido trifosfato) y 2,4 mM de MgSO_4).
- 10 μM de cada cebador: AV159, AV192.
- 40 mM de MgSO_4 (Invitrogen™, EE. UU).
- 1 μL de enzima *Super Script™ III RT/Platinum® Taq High Fidelity* (Invitrogen™, EE. UU).
- 10 U de Protector de RNasa (Roche *diagnostics*, EE. UU).

Mezcla para la RT-PCR del fragmento de 2.102 pb (integrasa viral)

- 25 μL de Buffer *2X Reaction Mix*, (0,4 mM de cada dNTP y 2,4 mM de MgSO_4).
- 20 μM de cada cebador: kvl068 y kvl069.
- 50 mM de MgSO_4 .
- 1 μL de enzima *SuperScript™ III RT/Platinum® Taq High Fidelity*.
- 40 U de Protector de RNasa (Roche *diagnostics*, EE. UU).



Finalmente, a estas mezclas se les agregaron 10 µL del ARN extraído para un volumen final de reacción de 50 µL. Las condiciones de las reacciones de RT-PCR para ambos fragmentos génicos se describen en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Condiciones para la síntesis de ADNc y amplificación del fragmento de 2.060 pb correspondiente a la proteasa y transcriptasa inversa del VIH-1.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	55 °C	30 min
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
40 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	52 °C	30 segundos
Extensión	68 °C	3 min
Fin de los ciclos		
Extensión final	68 °C	5 min
Enfriamiento	4 °C	12 horas

Fuente: Tomado de Aleman y cols., 2015 ⁽¹⁰¹⁾.

Tabla 3. Condiciones para la síntesis de ADNc y amplificación del fragmento de 2.102 pb correspondiente a integrasa del VIH-1.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	55 °C	30 min
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
40 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	53 °C	30 segundos
Extensión	68 °C	2 horas: 30 min
Fin de los ciclos		
Extensión final	68 °C	5 min
Enfriamiento	4 °C	12 horas

Fuente: Tomado de Van Laethem y cols., 2005 ⁽¹⁰²⁾.

III.4.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa anidada del gen pol

La reacción de PCR anidada se realizó para la amplificación de dos fragmentos, uno de 1.770 pb; que codifica para la proteasa y transcriptasa inversa y otro de 1.055 pb; que codifica para la integrasa del VIH-1. Se utilizó el estuche comercial *Expand High Fidelity PCR System* (Roche *diagnostics*, EE. UU), según las instrucciones del fabricante. Este



sistema contiene una enzima ADN polimerasa con actividad exonucleasa 3'-5', por tanto, fue necesario preparar la mezcla de la reacción en dos tubos separados, uno que contenía la enzima y otro que contenía los cebadores, para prevenir la degradación de los mismos.

Seguidamente se describen los componentes de las mezclas de reacción de PCR para la amplificación de los fragmentos antes mencionados. Las secuencias de los cebadores que fueron utilizados para este fin se describen en el anexo 1.

Mezcla para la PCR del fragmento de 1.770 pb (proteasa y transcriptasa inversa)

A un primer tubo se le adicionaron:

- 10 mM de cada dNTPs.
- 2,5 μ M de cada cebador, av190, av191, av70, av84.
- Completar con agua hasta un volumen de 23 μ L.

La segunda mezcla se preparó con:

- 5 μ L de 10X *Expand Buffer* (Roche diagnostics, EE. UU).
- 150 mM de $MgCl_2$.
- 2,6 U de *Expand HF Enzyme* (Roche diagnostics, EE. UU).

Mezcla para la PCR del fragmento de 1.055 pb (integrasa viral)

- 10 mM de cada dNTPs.
- 20 μ M de cada cebador, KVL070 y KVL084
- Completar con agua hasta un volumen de 24 μ L.

La segunda mezcla se preparó con:

- 5 μ L de 10X *Expand Buffer*.
- 25 mM de $MgCl_2$.
- 3,5 U de *Expand HF Enzyme* (Roche diagnostics, EE. UU).

Finalmente se adicionaron 2 μ L del ADNc amplificado al tubo que contenía 23 μ L de la mezcla uno (24 para el PCR de integrasa). Luego se añadieron 25 μ L de la segunda mezcla a cada tubo de reacción, para obtener un volumen final de 50 μ L. Las condiciones de las reacciones de PCR para ambos fragmentos génicos se describen en las tablas 4 y 5, respectivamente.



Tabla 4. Condiciones para la RCP anidada del fragmento de 1.770 pb correspondiente a la proteasa y transcriptasa inversa del VIH-1.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
30 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	59 °C	30 segundos
Extensión	68 °C	3 min
Fin de los ciclos		
Extensión final	72 °C	10 min
Enfriamiento	4 °C	12 horas

Fuente: Tomado de Aleman y col., 2015 ⁽¹⁰¹⁾.

Tabla 5. Condiciones para la RCP anidada del fragmento de 1.055 pb correspondiente a la integrasa del VIH-1.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
10 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	53 °C	30 segundos
Extensión	72 °C	1 hora: 30 min
Fin de los ciclos		
Extensión final	72 °C	5 segundos
30 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	53 °C	30 segundos
Extensión	72 °C	1 hora: 30 min
Fin de los ciclos		
Extensión	72 °C	5 segundos
Extensión final	72 °C	7 min
Enfriamiento	4 °C	12 horas

Fuente: Tomado de Van Laethem y cols., 2005 ⁽¹⁰²⁾.

Se utilizó un control negativo constituido por agua en lugar de ADN. Este se incluyó en cada ensayo desde el paso de extracción del ARN con el objetivo de descartar posibles inhibiciones o contaminaciones en la RCP.



III.4.1.4. Análisis de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa anidada

Se tomaron 10 μ L de los productos obtenidos en la RCP anidada y 2 μ L del colorante de corrida (Azul/Naranja 6X *loading Dye*, Promega, EE. UU), se mezclaron y aplicaron en un gel de agarosa al 1 %, teñido con colorante GelRed[®] (Biotium, San Francisco. EE. UU). El gel se sometió a una electroforesis horizontal con tampón de corrida TBE: 0,4 M de Tris-HCl; 0,5 M de ácido bórico y 0,01 M de ácido etilén-diamino tetracético (EDTA). La separación se realizó a 120 Volt durante 30 min. Posteriormente se visualizó el gel mediante un transiluminador de luz ultravioleta (*Spectroline®Bi-O-VisionTM*, Alemania). Las tallas correctas de la amplificación (1.770 y 1.055 pb, correspondientes a cada fragmento) se determinaron comparándolas con el patrón de migración del marcador de peso molecular DNA Molecular *Weight Marker XIV* (Roche *diagnostics*, EE. UU).

III.4.1.5. Purificación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa anidada

Los productos de la RCP anidada se purificaron con el estuche comercial *QIAquick® PCR Purification Kit* (Roche *diagnostics*, EE. UU), según el protocolo indicado por el fabricante.

III.4.1.6. Secuenciación de ácidos nucleicos por el método de Sanger

Se realizó la secuenciación nucleotídica de los fragmentos amplificados a partir del gen *pol*, que abarcan 1.302 pb correspondientes a 297 nucleótidos correspondientes a 99 aminoácidos (aa) para la región de proteasa, y 1.005 nucleótidos que codifican para 335 aa de la transcriptasa inversa del VIH-1. En el caso de la región de la integrasa viral, se secuenció un fragmento de 890 pb. Para este procedimiento se emplearon los cebadores de secuencia descritos en el anexo 1

Se realizaron siete reacciones de secuencia por cada producto de RCP anidada purificado, con el objetivo de solapar el mismo fragmento con varias secuencias.

Se prepararon mezclas para cada reacción de secuenciación que consistieron en: 8 μ L de la mezcla de secuencia *DTCS Quick Star Master Mix (Dye Terminador Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit*, de Beckman Coulter, EE. UU), 6 μ L de H₂O libre de nucleasas, 1 μ L de cada uno de los cebadores (anexo 1) y 5 μ L de ADN purificado, para obtener un volumen final de reacción de 20 μ L. Para la reacción de secuencia se realizaron 50 ciclos con los



siguientes pasos: 96 °C por 30 segundos, luego 20 segundos a 50°C y finalmente 4 min a 60°C.

III.4.1.7. Edición de las secuencias

Las secuencias obtenidas de cada uno de los fragmentos del VIH-1 se ensamblaron y editaron en el programa *Sequencher™* versión 4.9 (*Genes Codes Corporation*, EE. UU), y se utilizó como referencia la secuencia nucleotídica de la cepa de VIH-1 B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU.K03455.

III.4.1.8. Análisis de las mutaciones virales y niveles de resistencia

Las secuencias consenso que se obtuvieron para las muestras de cada paciente se enviaron a la base de datos de Stanford (<https://hivdb.stanford.edu/hivseq/by-sequences/>) que detecta las mutaciones en cada gen e informa la resistencia que ellas confieren a cada ARV, y que se clasifican de la siguiente forma: resistencia alta, intermedia, baja, potencialmente baja y sensible.

III.4.2. Secuenciación de próxima generación

El ensayo de genotipado del VIH-1 Sentosa SQ® consiste en un flujo de trabajo integrado que comprende diferentes pasos, entre los que se encuentran: extracción del ARN, preparación de bibliotecas, PCR de emulsión, enriquecimiento y secuenciación masiva mediante la plataforma Ion Torrent™ (Ion PGM, Ion PROTON), (*Thermo Fisher Scientific*. EE. UU) <https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/ion-torrent.html>. El sistema se basa en la detección de protones liberados durante el proceso de polimerización del ADN y cuenta con un paquete informático de análisis de datos y generación de informes. El ensayo procesa hasta 15 muestras simultáneamente (730 mL por muestra); que incluye toda la proteasa viral PR, los primeros 376 aminoácidos de la TI y todo el gen de IN.

III.4.2.1. Extracción del ARN y Pre-PCR

La extracción del ARN se realizó simultáneamente a 15 muestras de plasma. Los reactivos a utilizar estuvieron dispuestos en los estuches comerciales que provee el sistema Vela Diagnostics: *ViroKey™ SQ FLEX LibPrep*, en el *ViroKey™ SQ FLEX HIV Primer Set* y en el *Sentosa SX Virus Total Nucleic Acid Plus*. El proceso se llevó a cabo en el extractor



automático Sentosa SX 101 (Vela *Diagnostics*, Singapur), según las recomendaciones del fabricante.

Los plasmas se descongelaron a temperatura ambiente, luego se homogenizaron por 5 segundos y se centrifugaron a 4.233 r.p.m (1.200 g) por 10 minutos. Luego se transfirieron 730 μ L a viales de 1,5 mL, rotulados previamente. Se colocaron los reactivos e insumos en el extractor y luego de tres horas y media se extrajo la placa de PCR de 96 pocillos, se selló a 170 °C por 3 segundos con un sellador (*PCR Plate Sealler*, BIO-RAD, EE. UU) y se centrifugó a 1.338 r.p.m (100 g) por 30 segundos. La PCR se llevó a cabo en un termociclador para placas de 96 pocillos (Veriti DX, Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y se empleó el programa *ViroKey SQ FLEX PCR Amplification* (Vela *Diagnostics*, Singapur), bajo las siguientes condiciones (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones para la síntesis de ADNc y amplificación de los fragmentos correspondientes a la proteasa, transcriptasa inversa e integrasa del VIH-1.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	50 °C	30 min
Desnaturalización inicial	98 °C	2 min
40 ciclos		
Desnaturalización	98 °C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	55 °C	30 segundos
Extensión	72 °C	3 min
Fin de los ciclos		
Extensión final	72 °C	2 min
Enfriamiento	4 °C	12 horas

Fuente: Tomado de *ViroKey™ SQ FLEX Genotyping Assay, Quick Reference Guide Part 1ª*.

Como resultado de la reacción de amplificación se obtuvieron dos amplicones, de 1.500 y de 1000 pb, correspondientes a la proteasa/TI y la integrasa viral, respectivamente.

III.4.2.2 Preparación de la librería

Los reactivos que se utilizaron estaban dispuestos en el estuche comercial *ViroKey™ SQ FLEX LibPrep* y *ViroKey™ SQ Virus testing Solutions*. Además, se utilizó la placa de PCR con los amplicones, la placa de los reactivos (*ViroKey™ SQ FLEX LibPrep Reagent Plate*), proveniente del proceso de extracción, y el código identificador del control del sistema. Se



rotularon dos viales de 1,5 mL como FLT (tubo con la librería final, del inglés, *finally library tube*) y PLT (tubo con la librería combinada, del inglés, *pooled library tube*) y se colocaron en la gradilla para muestras, en las posiciones que indicó el protocolo. El proceso se llevó a cabo en el propio extractor automático, según las recomendaciones del fabricante.

Luego de 5,5 horas, los tubos rotulados como FLT y PLT se cerraron y sacaron del equipo para su almacenamiento por un periodo máximo de hasta un mes a -20 °C hasta la realización del siguiente paso del proceso.

III.4.2.3 Preparación del PCR de emulsión y enriquecimiento

Para el PCR de emulsión se utilizaron los reactivos dispuestos en el estuche comercial *Sentosa ST Template Kit*. El proceso se llevó a cabo en el equipo ST401i (*Ions Torrent, Vela Diagnostics, Singapur*), según las recomendaciones del fabricante.

Para el proceso de enriquecimiento se extrajeron los tubos del equipo y se procedió a eliminar las partículas iónicas en las que no ocurre amplificación, según indica el fabricante. Para ello se utilizó el equipo ST401e (*Ions Torrent, Vela Diagnostics, Singapur*). Las partículas esféricas iónicas enriquecidas, quedaron contenidas en un vial de 0,2 µL que puede ser almacenado de 2-8 °C durante una semana.

III.4.2.4 Secuenciación

Los reactivos que se utilizaron estuvieron dispuestos en los estuches comerciales *Sentosa SQ Sequencing Kit* y en el *Sentosa SQ 318 Chip kit*. Todos los reactivos se colocaron en una microplaca semiconductora (chip), con pozos en los que se depositaron las partículas esféricas enriquecidas, donde ocurre la reacción de secuenciación. El proceso se llevó a cabo en el equipo de secuenciación SQ301 (*Ions Torrent, Vela Diagnostics, Singapur*), según las recomendaciones del fabricante.

III.4.2.5. Control de calidad

El ensayo de genotipado del VIH-1 *Sentosa SQ* proporciona un control del sistema para cada ejecución, procesado desde la extracción como la muestra número 16. El control del sistema actúa como un control positivo y negativo. Cada muestra que se incluyó en el análisis pasó los controles de calidad de ejecución y de muestra.⁽¹⁰³⁾



III.4.2.6. Lectura e interpretación de las secuencias

Para la comparación de las secuencias generadas por Sanger y NGS solo se utilizaron los primeros 1.300 nucleótidos del fragmento del gen *pol* que codifica para la proteasa completa (99 aa) y la reverso transcriptasa (1 al 335 aa). En el caso de la integrasa se compararon los 864 nucleótidos de la secuencia del gen que codifica para la integrasa viral (288 aa).

Para los fines de este estudio, el ensayo exporta un archivo en formato FASTA que contiene una única secuencia de nucleótidos consenso en la que las posiciones que contienen mezclas de nucleótidos con variantes presentes en un 3,2 % o más, se representan como ambigüedades según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, del inglés, *International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Aunque el ensayo Sentosa tiene su propio proceso de análisis, incluido un informe de susceptibilidad que utiliza tres algoritmos de resistencia a los medicamentos contra el VIH (versión 9.0 de Stanford HIVdb, versión 30 de ANRS y versión 10.0 de Rega), se utilizó directamente la versión 9.6 de Stanford HIVdb (actualizada el 09 de marzo de 2024), para llevar a cabo una interpretación más actualizada de todos los parámetros a comparar. Para las secuencias PR-TI concatenadas y para las secuencias de la IN, los archivos en formato FASTA obtenidos por el método de Sanger y por NGS se analizaron mediante el programa de interpretación de resistencia genotípica de la base de datos de resistencia a los medicamentos contra el VIH de Stanford (HIVdb).

Se realizaron análisis por separado para PR-TI e INT. De la base de datos se obtuvieron hojas de cálculo con los resúmenes de resistencia, las cuales se utilizaron para comparar las MDR y la interpretación de resistencia a los medicamentos mediante secuenciación por el método de Sanger y por NGS. Asimismo, para determinar la concordancia en la detección de resistencia a los antirretrovirales más comúnmente utilizados. Los ITIAN: lamivudina/emtricitabina (3TC/ FTC; que se consideraron como un solo medicamento), abacavir (ABC), zidovudina (AZT) y tenofovir (TDF); Los ITINAN: efavirenz (EFV), etravirina (ETR), rilpivirina (RPV), nevirapina (NPV) y doravirina (DOR); los inhibidores de la proteasa atazanavir (ATV), darunavir (DRV) y lopinavir (LPV); y Los inhibidores de la integrasa: dolutegravir (DTG), elvitegravir (EVG), raltegravir (RAL), bictegravir (BIC) y cabotegravir (CAB). Se definieron cinco niveles de interpretación de resistencia a los medicamentos:



susceptible, potencial de bajo nivel de resistencia, resistencia de bajo nivel, resistencia intermedia y resistencia de alto nivel ⁽¹⁰⁴⁾. Los puntajes de penalización utilizados para generar estos niveles fueron los de la base de datos HIVdb versión 9.6, actualizada el 09 de marzo de 2024. Los niveles de resistencia a los medicamentos según el sistema de interpretación de HIVdb, se puntuaron de la manera siguiente: (1) para susceptible, (2) potencialmente bajo, (3) resistencia de baja, (4) resistencia intermedia y (5) resistencia de alta.

Además, las hojas de cálculo generadas por el sistema NGS se utilizaron para comparar la cantidad de mutaciones distintivas de APOBEC y la proporción de posiciones con mutaciones altamente inusuales, la presencia de codones de parada, inserciones, deleciones, mutaciones ambiguas, cambios en el marco de lectura y comienzo y fin de cada fragmento de la proteína secuenciada.

III.4.2.7. Análisis filogenético

Se analizaron las variantes genéticas virales (subtipos de VIH-1), tanto en el fragmento del gen *pol*, que codifica para la proteasa-transcriptasa reversa, como para el que codifica para la integrasa, y se introdujeron las secuencias en tres bases de datos:

1) Los Álamos

https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html

2) *Rega subtyping tool* versión 3.46

<https://www.genomedetective.com/app/typingtool/hiv>

3) *RIP*

<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>.

El análisis de recombinación se llevó a cabo mediante *boostscanning* utilizando el programa SimPlot V, versión 3.5.1.



III.5. Análisis estadístico

El análisis de los datos cuantitativos se realizó con el paquete estadístico *GraphPad Prism*, versión 5.0. Se determinó la distribución de los datos (normal o no) mediante la prueba estadística de Shapiro-Wilk y se compararon las medias para muestras pareadas mediante la prueba de Wilcoxon con el empleo del paquete estadístico SPSS, versión 27 (IBM, EE. UU). Todas las comparaciones se realizaron por ambas tecnologías de secuenciación con respecto a: detección de las mutaciones del VIH-1 en los genes que codifican para la PR-TI e INT (totales y MDR), niveles de resistencia a los fármacos ARV, y subtipos y variantes virales del VIH-1.

Para el cálculo de las medias del número de mutaciones totales y MDR, tanto las compartidas como las únicas, de cada fragmento secuenciado (PR-TI e INT) por ambas tecnologías (NGS y Sanger), se sumaron todas las mutaciones obtenidas para cada paciente y se dividieron entre el total de pacientes analizados (N=28). Para realizar este análisis se utilizó como referencia el artículo de Tzou P L y col., 2018 ⁽²⁷⁾.

Para el cálculo de los indicadores de desempeño (sensibilidad, especificidad, concordancia, y coincidencia diagnóstica mediante el índice Kappa) del método de secuenciación masiva, con respecto a la prueba de referencia, se empleó la aplicación LabCalc, versión 1.0.1. Para ello se consideraron como verdaderos positivos a todas las mutaciones detectadas por Sanger (840), mientras que los verdaderos negativos se obtuvieron restando al total de pares de base del gen que codifica para las proteínas (TI+PR+INT=2.166), el total de mutaciones que arrojó el método de Sanger (840). Los falsos positivos fueron aquellas mutaciones detectadas únicamente por NGS (224) y los falsos negativos las identificadas únicamente por el método de Sanger (82).

III.6. Aspectos éticos

La investigación se desarrolló según las normas de la Declaración de Helsinki ⁽¹⁰⁵⁾ y las Guías Éticas Internacionales del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas para estudios biomédicos en sujetos humanos (CIOMS, del inglés, *Council for International Organizations of Medical Sciences*)⁽¹⁰⁶⁾.



Cada muestra recibió un código único que la identificó y a los documentos que la acompañaron. La identidad de cada paciente solo fue conocida por los investigadores responsables del estudio para mantener la confidencialidad de la procedencia de la misma y la identidad de los participantes. La investigación se enmarcó dentro del proyecto titulado: Caracterización biológica y genética de cepas de VIH-1 de individuos cubanos. Código: 2105015.

Las muestras que se incluyeron en el estudio fueron parte del diagnóstico para las pruebas de resistencia a los ARVs que se realiza en el laboratorio de ITS del IPK, por lo que los pacientes fueron remitidos por los especialistas que solicitaron estas pruebas.

Los pacientes incluidos en la investigación se beneficiaron con su participación pues se les realizaron ensayos genotípicos para el VIH-1 con tecnología de última generación, y esto contribuyó al mejor manejo clínico y terapéutico.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS



IV. RESULTADOS

La secuenciación por Sanger se utilizó y aun se utiliza para identificar variantes de VIH resistentes a los ARVs y ha sido altamente reproducible en diferentes entornos clínicos. Sin embargo, las tecnologías de NGS evolucionaron rápidamente, lo que trajo consigo cambios en los protocolos de análisis bioinformático y de laboratorio ⁽²⁷⁾. El IPK recientemente adquirió un Sentosa® SQ (Vela *Diagnostics*), el que ha sido validado para su uso en el diagnóstico clínico. La epidemia de VIH-1 en Cuba se caracteriza por una gran variabilidad viral, que pone a prueba los ensayos tanto de PCR como de secuenciación, cualesquiera sean las plataformas que se empleen. Por ello el presente estudio se propone, implementar el ensayo de NGS para estudios genotípicos del VIH-1 en pacientes cubanos no tratados, infectados con diferentes variantes virales y determinar si la secuenciación masiva Sentosa® SQ (Vela *Diagnostics*) resulta más sensible y específica que el método de Sanger para la obtención de datos referentes a estudios genotípicos de VIH-1.

IV.1. Mutaciones, MDR e interpretaciones de la resistencia a los medicamentos

En las 28 secuencias procesadas el número de mutaciones compartidas en el fragmento que codifica para la PR-TI fue de 795, mientras que en el que codifica para la INT viral las mutaciones compartidas fueron 462, por el método de Sanger y por NGS, respectivamente. El total de MDR detectadas por ambos sistemas fue de 22 en PR-TI y de 4 en la INT. Estas mutaciones estuvieron definidas como las diferencias con respecto a la secuencia consenso de aminoácidos del subtipo B de la base de datos de Stanford (Tabla 7, figura 7 A y B).



Tabla 7. Media del número de mutaciones aminoacídicas y MDR detectados en PR-TI mediante pruebas de resistencia genotípica por la secuenciación de Sanger y NGS^a

Gen y categoría de la mutación ^b n (número de secuencias)		Total de mutaciones		Media		Valor de p ^c
		Sanger	NGS	Sanger	NGS	
PR-TI ^d (n=28)	Nº de mutaciones	840	942			
	compartidas	795		28,39		
	únicas	45	147	1,575	4,821	0,0006
	Nº de MDRs	22	33			
	compartidas	22		0.785		
	únicas	0	11	0,000	0,3929	0,0104
INT ^e (n=28)	Nº de mutaciones	499	525			
	compartidas	462		16,5		
	únicas	37	63	1,321	2,143	0,05
	Nº de MDRs	4	7			
	compartidas	4		0,14		
	únicas	0	3	0	0,1071	0,5

^a Las mutaciones aminoacídicas se definen como diferencias con respecto a la secuencia de referencia de consenso del subtipo B. Las mutaciones de resistencia a medicamentos (MDR) son mutaciones que reciben una puntuación de penalización en el programa de interpretación de resistencia a medicamentos de HIVDB.

^b Las mutaciones compartidas y las MDR son aquellas que se detectaron mediante secuenciación NGS y Sanger. Las mutaciones únicas y las MDR son aquellas que se detectaron mediante secuenciación NGS o Sanger, pero no mediante ambas.

^c Los valores de *p* se determinaron mediante la prueba Wilcoxon para muestras pareadas.

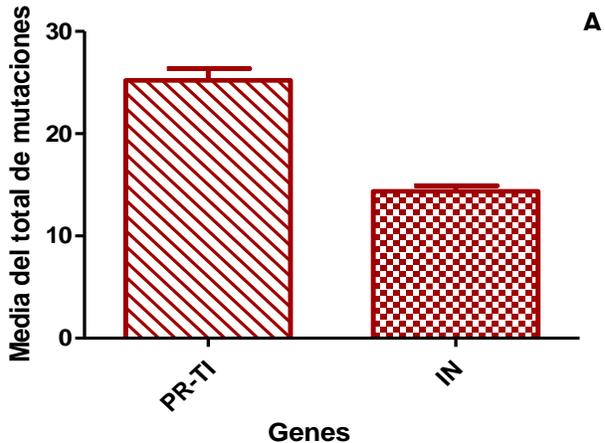
^{d,e} **PR**: proteasa viral, **RT**: Reverso transcriptasa viral, **INT**: Integrasa viral.

Al comparar el número de mutaciones únicas detectadas por ambos sistemas, en ambos fragmentos, encontramos que en PR-TI, el método de Sanger detectó únicamente 45 mutaciones y NGS 147 ($p=0,0006$); mientras que en la INT viral se hallaron 37 mutaciones por la secuenciación de Sanger y 63 por NGS ($p=0,05$). No se detectaron MDR por el método de Sanger en la PR-TI, mientras que por NGS se encontraron 11 mutaciones ($p=0,0104$). Sin embargo, en la INT viral solo se hallaron 3 mutaciones por NGS ($p=0,5$) (Tabla 7, figura 7 C y D).

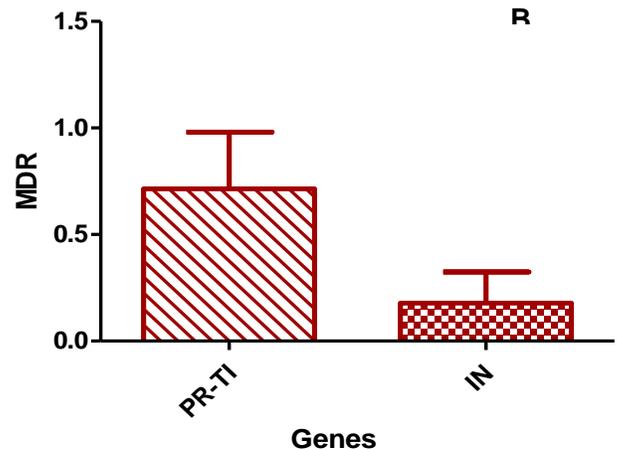
De las once MDR detectadas por NGS en PR-TI, cinco estaban presentes por debajo del umbral del 20 %. En la INT, el método de NGS únicamente detectó 3 MDR, una por debajo del umbral del 20 % y las otras dos como mezclas (salvaje/mutado).



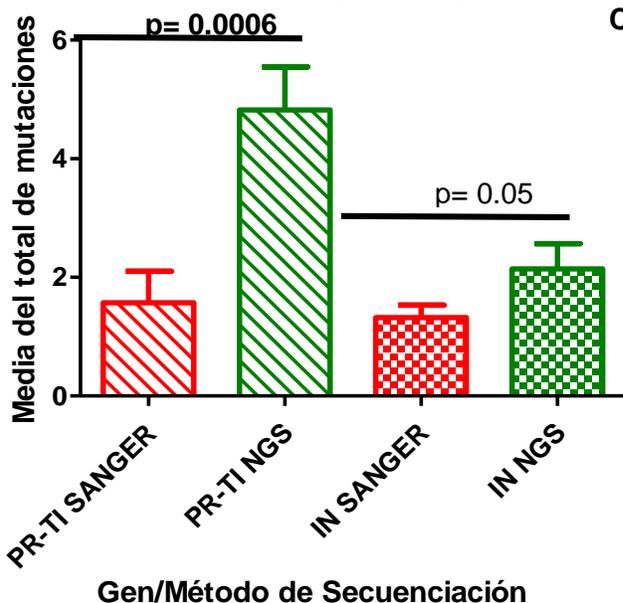
Mutaciones compartidas Sanger y NGS



MDR compartidas Sanger y NGS



Mutaciones únicas



MDR únicas

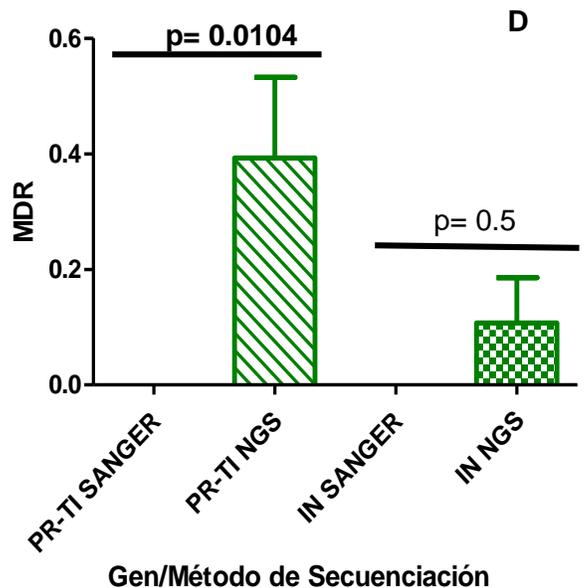


Figura 7. Media del total de mutaciones y MDR, únicas y compartidas en PR-TI e INT detectadas por Sanger y NGS.

Los cambios aminoacídicos se definen como diferencias con respecto a la secuencia de referencia de consenso del subtipo B. Las mutaciones de resistencia a medicamentos (MDR) son mutaciones que reciben una puntuación de penalización en el programa de interpretación de resistencia a medicamentos de HIVDB.

A y B: Las mutaciones compartidas son los cambios aminoacídicos detectados por ambos sistemas.

C y D: Las mutaciones únicas son aquellas que solo se encontraron en uno de los dos sistemas de secuenciación en estudio.

Los valores de *P* se determinaron mediante la prueba Wilcoxon para muestras pareadas.

PR: proteasa viral, **TI:** transcriptasa inversa viral, **INT:** Integrasa viral, **MDR:** mutaciones asociadas a resistencia.



No se obtuvieron diferencias significativas entre la media de los niveles de resistencia detectados para cualquiera de los ITIAN, ITINAN, IPR e IINT entre la secuenciación de Sanger y la NGS (Tabla 8).

Tabla 8. Media de la susceptibilidad reducida a los ARV según las pruebas de resistencia genotípica mediante secuenciación de Sanger frente a NGS.

Clase de ARVs ^a	ARV ^b	Susceptibilidad ^c (M ± DS) ^d		Valores de P ^e
		Sanger	NGS	
ITIAN (n=28)	ABC	1,179 ± 0,6696	1,25 ± 0,8444	0,3458
	AZT	1,393 ± 1,166	1,607 ± 1,370	0,5
	FTC	1,036 ± 0,1890	1,143 ± 0,7559	1
	3TC	1,036 ± 0,1890	1,143 ± 0,7559	1
	TDF	1,179 ± 0,6696	1,214 ± 0,6862	1
ITINAN (n=28)	DOR	1,036 ± 0,1890	1,071 ± 0,2623	1
	EFV	1,607 ± 1,370	1,821 ± 1,492	0,1736
	ETR	1,214 ± 0,6862	1,321 ± 0,7228	0,1489
	NPV	1,643 ± 1,446	1,964 ± 1,621	0,25
	RPV	1,250 ± 0,7515	1,464 ± 0,9222	0,1489
IPR (n=28)	ATV	1,036 ± 0,1890	1,214 ± 0,7868	0,5
	DRV	1,036 ± 0,1890	1 ± 0	1
	LPV	1,036 ± 0,1890	1,071 ± 0,2623	1
IINT (n=28)	BIC	1,143 ± 0,7559	1,179 ± 0,7724	1
	CAB	1,143 ± 0,7559	1,214 ± 0,8325	1
	DTG	1,143 ± 0,7559	1,179 ± 0,7724	1
	EVG	1,143 ± 0,7559	1,25 ± 0,8444	0,5
	RAL	1,143 ± 0,7559	1,25 ± 0,8444	0,5

^a ITIAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, ITINAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos, IPR: Inhibidores de la proteasa, IINT: Inhibidores de la integrasa.

^b ARV: Antiretrovirales, 3FTC, lamivudina y emtricitabina; ABC, abacavir; AZT, zidovudina; TDF, tenofovir; EFV, efavirenz; ETR, etravirina; RPV, rilpivirina; DOR, doravirina; NPV, nevirapina; ATV/r, atazanavir/ritonavir-potenciado; DRV/r darunavir/ritonavir-potenciado; LPV/r, lopinavir/ritonavir-potenciado; DTG, dolutegravir; EVG, elvitegravir; RAL, raltegravir, BIC, bictegravir; CAB, cabotegravir.

^c Niveles previstos de resistencia a los medicamentos según el sistema de interpretación de resistencia genotípica HIVDB, que se puntuaron de la siguiente manera: 1 para susceptible, 2 potencialmente bajo, 3 resistencia de baja, 4 resistencia intermedia y 5 resistencia de alta.

^d M: Media, SD: Desviación estándar.

^e Los valores de P se determinaron mediante la prueba Wilcoxon para muestras pareadas.



En general, 9 virus (32,12 %) mostraron un mayor nivel de resistencia a uno o más ITIAN, ITINAN, IPR e IINT por el método de NGS. En ninguna muestra viral se detectó un nivel de resistencia más alto, según la secuenciación de Sanger (Tablas 9, 10, 11 y 12).

Se detectaron cuatro mutaciones relacionadas con resistencia a los ITIAN en tres pacientes, por la tecnología NGS, una de ellas por debajo del umbral de detección del método de Sanger D67DN (6,72 %). Sin embargo, las otras tres mutaciones mostraron umbrales que debieron haber sido detectados por esta técnica S68G (55,3 %); T215Y (70,93 %); M184MV (32,29 %), (Tabla 9).

Tabla 9. Mutaciones de resistencia a los ITIAN y estimado de los niveles de resistencia según el ensayo de resistencia genotípica de las secuencias obtenidas por Sanger y NGS.

Muestras para las que NGS mostro altos niveles de resistencia ≥ 1 (ITIAN)	DRM detectada por:			puntuación por Sanger >>>> puntuación por NGS ^a			
	Sanger y NGS	Sanger solo	NGS solo	3FTC	ABC	AZT	TDF
1490_22	-	-	D67DN	1	1	1->3	1
1790_22	-	-	S68G T215Y	1	1-> 2	1-> 5	1-> 2
P7-23	D67N, K70R T215Y, K219E	-	M184MV	1-> 5	2-> 5	4-> 5	2-> 4

^a Niveles previstos de resistencia a los medicamentos según el sistema de interpretación de resistencia genotípica HIVDB, que se puntuaron de la siguiente manera: 1 para susceptible, 2 potencialmente bajo, 3 resistencia de baja, 4 resistencia intermedia y 5 resistencia de alta. Para 5 secuencias adicionales, la NGS detectó dos mutaciones en una posición MDR para la que la secuenciación de Sanger detectó una sola mutación. Sin embargo, la mutación adicional no resultó en un cambio en el nivel estimado de resistencia a los medicamentos. 3FTC, lamivudina and emtricitabina; ABC, abacavir; AZT, zidovudina; TDF, tenofovir.



La tecnología NGS evidenció cuatro secuencias virales con mutaciones asociadas a la pérdida de la sensibilidad a los ITINAN, dos de ellos por debajo del umbral de detección del método de Sanger H221Y (3,74 %); K103N (17,06 %). Sin embargo, la E138Q con 55,72 % debió haber sido detectada por esta técnica. La secuencia viral del paciente 16 (P16) reveló una mezcla de aminoácidos en la posición 98 de la RT (A98GPR), detectada solamente por la metodología de NGS (Tabla 10).

Tabla 10. Mutaciones de resistencia a los ITINAN y estimado de los niveles de resistencia según el ensayo de resistencia genotípica de las secuencias obtenidas por la secuenciación de Sanger y por NGS.

Muestras para las que NGS mostro altos niveles de resistencia ≥ 1 (ITINAN)	DRM detectada por:			puntuación por Sanger >>>> puntuación por NGS ^a				
	Sanger y NGS	Sanger solo	NGS solo	EFV	ETR	RPV	NPV	DOR
1790_22	K103KN	-	E138Q	5	1→2	1→3	5	1
P4_23	-	-	H221Y	1→2	1→2	1→3	1→3	1→2
P13_24	-	-	K103N	1→5	1	1	1→5	1
P16_24	-	-	A98GPR	1→2	1→2	1→3	1→4	1→2

^a Niveles previstos de resistencia a medicamentos según el sistema de interpretación de resistencia genotípica HIVDB, que se puntuaron de la siguiente manera: 1 para susceptible, 2 potencialmente bajo, 3 resistencia de baja, 4 resistencia intermedia y 5 resistencia de alta. EFV, efavirenz; ETR, etravirina; RPV, rilpivirina DOR, doravirina; NPV, nevirapina.

Por el método de NGS se identificaron dos virus, con una mutación cada uno, asociados a resistencia a los IPR, ambas por debajo del umbral de detección de Sanger I50LFM (3,63 %) y M46ML (4,22 %), (Tabla 11).



Tabla 11. Mutaciones de resistencia a los IPR y estimado de los niveles de resistencia según el ensayo de resistencia genotípica de las secuencias obtenidas por Sanger y NGS.

Muestras para las que NGS mostro altos niveles de resistencia ≥ 1 (IPR)	DRM detectada por:			puntuación por Sanger >>>> puntuación por NGS ^a		
	Sanger y NGS	Sanger solo	NGS solo	ATV/RTV	DRV/RTV	LPV/RTV
498_22	-	-	I50FLM	1→5	1	1
1490_22	-	-	M46ML	1→2	1	1→2

^a Niveles previstos de resistencia a fármacos según el sistema de interpretación de resistencia genotípica HIVDB, que se puntuaron de la siguiente manera: 1 para susceptible, 2 potencialmente bajo, 3 resistencia de baja, 4 resistencia intermedia y 5 resistencia de alta. Para dos secuencias adicionales, la NGS detectó dos mutaciones en una posición MDR para la que Sanger detectó una única mutación. Sin embargo, la mutación adicional no resultó en un cambio en el nivel estimado de resistencia a fármacos. ATV/r, atazanavir/ritonavir-boosted; DRV/r darunavi/ritonavir- potenciado; LPV/r, lopinavir/ritonavir-potenciado.

Para los IINT, por NGS se evidenciaron tres mutaciones en dos secuencias virales, una de ellas por debajo del umbral de detección de Sanger H51Y (3,73 %), y las otras dos en forma de mezclas, las que no fueron cuantificadas por el sistema NGS (S153SA, D232DN) (Tabla 12).

Tabla 12. Mutaciones de resistencia a los IINT y estimado de los niveles de resistencia según el ensayo de resistencia genotípica de las secuencias obtenidas por Sanger y NGS.

Muestras para las que NGS mostro altos niveles de resistencia ≥ 1 (IIN)	DRM detectada por:			puntuación por Sanger >>>> puntuación por NGS ^a				
	Sanger y NGS	Sanger solo	NGS solo	BIC	CAB	DTG	EVG	RAL
614_22	-	-	H51Y, S153SA	1→2	1→3	1→2	1→3	1→3
P12_23	-	-	D232DN	1→1	1→1	1→1	1→2	1→2

^a Niveles previstos de resistencia a los medicamentos según el sistema de interpretación de resistencia genotípica HIVDB, que se puntuaron de la siguiente manera: 1 para susceptible, 2 potencialmente bajo, 3 resistencia de baja, 4 resistencia intermedia y 5 resistencia de alta. DTG, dolutegravir; EVG, elvitegravir; RAL, raltegravir; BIC, bictegravir; CAB, cabotegravir.



IV.2. Parámetros comparados, detectados por HIVdb, en las secuencias obtenidas de PRRT e INT por ambos sistemas

Se secuenciaron 28 muestras empleando la metodología de NGS y Sanger (Tabla 13). La secuenciación mediante NGS abarcó la región completa de la INT viral, la PR y la RT en el total de las muestras.

Entre las secuencias de PR-TI generadas por NGS se identificaron codones de parada en RT: Q334*, PR: T12*, RT: P176* y mutaciones de APOBEC en PR: G27R, PR: G51E, RT: E53K, RT: E53K, RT: R72K.

Para las secuencias correspondientes al gen de la integrasa viral obtenido por NGS, se detectaron 4 con mutaciones de APOBEC en E152K, E157K, G82RS, G247E, D55N (una secuencia con dos mutaciones).

Tabla 13. Parámetros comparados, detectados por HIVdb, en las secuencias obtenidas de PRRT e INT por ambos sistemas.

Genes (aa)	Sanger		NGS	
	Completa ^a	Incompleta ^b	Completa	ncompleta
PR (aa 1 al 99)	22/28	4/28 (aa 13) 2/28 (aa 10 Y 40)	28/28	0/28
RT (aa 1 al 335)	24/28	4/28 (terminaron en el aa 312,317,318, 330)	28/28	0/28
INT (aa 1 al 288)	25/28	3/28 (comenzaron en el aa 11,21 y 40) 1/28 (terminó en el aa 259)	28/28	0/28
Parámetros detectados por HIVdb	PR-TI		INT	
	Sanger	NGS	Sanger	NGS
Cambios en el marco de lectura	0/28	0/28	0/28	0/28
Inserciones	0/28	0/28	0/28	0/28
Deleciones	0/28	0/28	0/28	0/28
Codones de parada	0/28	3/28	0/28	0/28
Mutaciones ambiguas	0/28	7/28	0/28	2/28
Mutaciones de APOBEC	4/28	3/28	0/28	4/28
Mutaciones inusuales	2/28	11/28	4/28	8/28

^a Completa: PR: del aa 1 al 99, RT: del aa 1 al 335, INT: del aa 1 al 288

^b Comienzan después del inicio de la proteína o terminan antes de su final



IV.3. Indicadores de desempeño de los ensayos de secuenciación comparados

La concordancia entre las secuencias de nucleótidos determinada, tanto en PR-TI como en INT, por los métodos de Sanger y NGS se comportó de la siguiente manera: el 84,8 % de los nucleótidos eran idénticos y el 15,2 % eran completamente discordantes.

La fuerza de concordancia entre ambos métodos fue buena (0,88), lo que se puede apreciar en la tabla 14.

Tabla 14. Indicadores de desempeño de los ensayos de secuenciación.

Con Sanger como referencia	Verdaderos + (Total por Sanger)	Verdaderos – (Total de pb – Total por Sanger)	Falsos + (Únicas Por NGS)	Falsos – (Únicas por Sanger)
	840	1326	224	82
Sensibilidad	0,91 (0,89 - 0,93)			
Especificidad	0,86 (0,84 - 0,87)			
Valor predictivo +	0,79 (0,76 - 0,81)			
Valor predictivo -	0,94 (0,93 - 0,95)			
Concordancia (IC 95%)	0,88 (0,86 - 0,89)			
Kappa (IC 95%)	0,74 (0,72-0,77)			
P	0,0000			

^a PR: Proteasa viral, RT: Reverso Transcriptasa viral, INT: Integrasa viral

^b Coeficiente de concordancia

^c Índice Kappa

^d Los valores de *P* se determinaron mediante la prueba de concordancia de Cohen



IV.4. Detección de subtipos y formas recombinantes

En la epidemia cubana se han descrito, hasta la fecha, la circulación de cinco formas recombinantes, dos de ellas complejas, CRF19_cpx y CRF18_cpx.

Debemos aclarar que la plataforma Vela no es capaz de subtipar el fragmento del gen que codifica para la integrasa viral, por esta razón, y la antes mencionada sobre la diversidad viral, se emplearon diversas plataformas para determinar el subtipo final de las secuencias obtenidas por ambos sistemas. Se emplearon: *Alamos db*, *Rega subtyping tool*, *RIP* (los Alamos db) y por último se tuvo que realizar un análisis de *SimPlot*, resultado que se muestra en la figura 8.

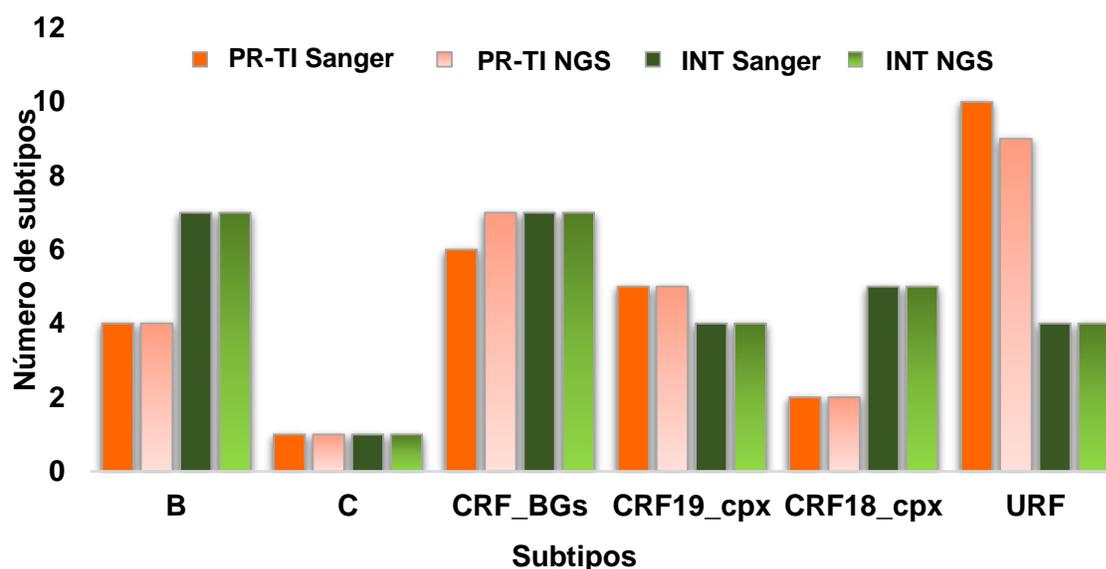


Figura 8. Distribución de subtipos en las regiones de PR-TI e INT para las secuencias obtenidas por ambos sistemas

PR-TI: Proteasa viral- Reverso Transcriptasa viral, **INT:** Integrasa viral

Luego del análisis mediante SimPlot para la obtención y comparación de los subtipos virales a partir de las secuencias derivadas de los sistemas en estudio, se encontró una coincidencia del 96,4 % y del 100 % en la PR-TI y la INT viral, respectivamente. Los subtipos más frecuentes detectados en PR-TI fueron las formas recombinantes únicas (10/28; 35,7



%) por el método de Sanger y en menor proporción por NGS (9/28; 32,1 %). Seguidamente, en orden de frecuencia se detectaron la CRF_BGs (6/28; 21,4 %) por Sanger y (7/28; 25,0 %) por NGS, la CRF19_cpx (5/28; 17,9 %), el subtipo B (4/28; 14,3 %), la CRF18_cpx (2/28; 7,1 %) y el subtipo C (1/28; 3,6 %). Mientras que en la INT viral los subtipos más frecuentes detectados fueron las formas recombinantes circulante BGs y subtipo B (7/28; 25,0 %), en igual proporción, seguida por la CRF18_cpx (5/28; 17,9 %), CRF19_cpx y URF (4/28; 14,3 %), en la misma frecuencia. Por último, en menor porcentaje se detectó el subtipo C (1/28; 3,6 %).

No coincidió el subtipo viral de la PR-TI en una secuencia obtenida por ambas tecnologías, detectada como CRF_BGs en la secuencia lograda por NGS y como URF en la obtenida por el método de Sanger.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN



V. DISCUSIÓN

Las pruebas de resistencia a los medicamentos contra el VIH-1 son importantes para elegir regímenes de TAR óptimos, prevenir el fracaso del tratamiento, detectar la evolución de la resistencia a los medicamentos y guiar la TAR de por vida. Durante décadas, la secuenciación por el método de Sanger se ha utilizado para las pruebas de resistencia a los medicamentos contra el VIH. Las principales limitaciones de la secuenciación de Sanger son el costo y, en particular, su incapacidad para detectar variantes de resistencia minoritarias (por debajo del 20 %) de las *cuasiespecies* virales ⁽¹⁰⁷⁾. Estas variantes minoritarias podrían ser importantes para el desarrollo de una mayor resistencia ⁽¹⁰⁸⁾. Si bien la secuenciación de próxima generación (NGS) puede detectar mutaciones de resistencia a los medicamentos con una mejor sensibilidad que el método de Sanger y algunas plataformas de prueba de resistencia a los medicamentos basadas en NGS ya están validadas y disponibles comercialmente, sus ventajas sobre la secuenciación de Sanger siguen siendo inciertas. Si se demuestra que es eficiente, esta tecnología en evolución podría convertirse en una plataforma más recomendada para las pruebas de resistencia a los medicamentos contra el VIH para la investigación, la atención clínica de rutina y la vigilancia ⁽²⁷⁾.

En estudios previos se evaluaron las concordancias y discrepancias entre la secuenciación de Sanger y la secuenciación de nueva generación para la identificación de mutaciones de resistencia a fármacos (MDR) asociadas al VIH utilizando una variedad de protocolos y plataformas de NGS ⁽¹⁰⁹⁻¹¹⁵⁾. La mayoría de los estudios encontraron una buena concordancia entre estas tecnologías en la identificación de MDR con umbrales de detección altos (>20 %), mientras que como se esperaba, la NGS fue superior para umbrales más bajos (<20 %) ⁽¹¹⁶⁾.

V.1. Mutaciones, MDR e interpretaciones de la resistencia a los medicamentos

La llegada de la terapia antirretroviral combinada (cART) revolucionó el manejo de la infección por VIH al suprimir eficazmente la replicación viral, restaurar la función inmunológica y mejorar la calidad de vida de los pacientes. A pesar de este avance, el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/sida y la OMS presentan un panorama mundial del VIH muy desafiante, ya que en 2024 las cifras de personas viven con



infecciones por VIH es de 39,9 millones, mientras que 1,3 millones adquirieron el virus recientemente. Se estima que 630 mil murieron debido a problemas relacionados con el VIH (2, 117). La yuxtaposición de estas asombrosas estadísticas con el telón de fondo de la innovación terapéutica subraya tanto el progreso logrado en el manejo del VIH como los desafíos persistentes que exigen nuestra atención (118).

En la actualidad, el tratamiento de los pacientes infectados con VIH abarca un conjunto diverso de medicamentos antirretrovirales que comprenden cinco clases distintas. Ellos tiene como objetivo actuar sobre enzimas que participan en distintas etapas del ciclo de vida del VIH, así encontramos a los inhibidores de la entrada, como el maraviroc y el enfuvirtide que interrumpen la unión y la fusión viral; los ITIAN e ITINAN, que impiden la conversión del ARN viral en ADNc; los INSTI que impiden la integración del ADN viral en el genoma del huésped; y los IP que imposibilitan la escisión de la poliproteína viral, inhibiendo así la maduración del virión (119).

Sin embargo, a pesar de estos avances terapéuticos, la aparición de cepas de VIH resistentes a los fármacos y resistentes a múltiples fármacos sigue siendo un desafío complejo. Como se destaca en el último Informe de la OMS sobre la resistencia a los fármacos contra el VIH, se ha observado un aumento exponencial de la resistencia adquirida y transmitida entre individuos sin tratamiento antirretroviral, lo que da como resultado el fracaso de la terapia antiretroviral combinada, la progresión de la enfermedad y un aumento de la mortalidad (120). La aparición de esas cepas resistentes plantea una barrera importante para alcanzar el objetivo de poner fin a la epidemia de VIH-1 como amenaza para la salud pública para el año 2030 (117) de ahí la urgencia resaltada por la OMS de combatir la problemática de la resistencia a los medicamentos contra el VIH, abogando por nuevas intervenciones para contrarrestar esta amenaza emergente para la salud pública mundial. Esto incluye implementar un monitoreo sistemático de la carga viral, mejorar la adherencia al tratamiento, realizar la genotipificación de la resistencia a los medicamentos, ajustar oportunamente el régimen terapéutico y seleccionar combinaciones antirretrovirales óptimas para garantizar una eficacia sostenida del tratamiento y resultados favorables a largo plazo.

La secuenciación por NGS ha surgido como una herramienta fundamental para aplicaciones clínicas, de investigación y de salud pública, reemplazando a la secuenciación por SS como



el método principal para la identificación y caracterización de genes en diversos organismos y virus, incluido el VIH ⁽¹¹⁴⁾. Si bien la SS puede detectar mutaciones de resistencia a medicamentos en el 20-30 % de la población viral, las tecnologías NGS ofrecen una sensibilidad y reproducibilidad superiores, identificando variantes de baja frecuencia hasta en el 5 % de la población viral total⁽¹²¹⁾. Los ensayos de resistencia a medicamentos contra el VIH mediante NGS ofrecen flexibilidad, lo que permite la secuenciación simultánea de varios genes del VIH mediante el uso de amplicones más largos o a través de la combinación de diferentes amplicones. Este proceso ocurre antes de la fragmentación y tagmentación del ADN durante la preparación de la biblioteca, lo que facilita el análisis de las variantes de VIH resistentes a los ARVs con una alta resolución ⁽¹²²⁾. La accesibilidad de la tecnología NGS, facilitada por estuches comerciales y canales de análisis, han permitido una secuenciación masiva en paralelo de alto rendimiento para identificar variantes de baja frecuencia, lo cual tiene diversas aplicaciones, incluidas las pruebas de resistencia al VIH ^(114, 115, 122, 123). Sin embargo, hace algunos años las plataformas de NGS disponibles, como *Illumina* estaban certificadas solo para uso en investigación, y por lo tanto, su uso era aún limitado para aplicaciones de diagnóstico clínico. En 2019, la plataforma NGS Sentosa® Vela *Diagnostics* logró la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés, *Food and Drugs Administration*) para la genotipificación del VIH y las pruebas de resistencia para fines de diagnóstico *in vitro* ⁽¹²⁴⁾. Esta plataforma Sentosa® basada en la tecnología “*Ion Torrent*” permite la secuenciación de los genes implicados en el desarrollo de mutaciones que le confieren resistencia al VIH con una sensibilidad para la detección de variantes menores del 10 %, cuando la carga viral (CV) es de 5.000 copias/ml o del 20 % cuando la CV es menor ⁽¹²²⁾. Varios estudios independientes han evaluado el rendimiento de la plataforma NGS Vela *Diagnostics* en contextos de investigación, a menudo con un número limitado de pacientes seleccionados, o solo con materiales de referencia ^(121, 125).

El sistema Vela NGS ofrece un flujo de trabajo optimizado que abarca un análisis integral dentro de una plataforma única. Al aprovechar la extracción automatizada del ARN, la distribución precisa de reactivos de PCR, la preparación perfecta de bibliotecas y el análisis bioinformático avanzado, la solución de Vela reduce notablemente el tiempo operativo y minimiza la probabilidad del error humano.



El objetivo de la presente investigación fue evaluar este novedoso sistema de monitoreo de la resistencia del VIH-1 frente a fármacos ARV, mediante NGS, en una población de pacientes infectados no tratados. Se investigaron, además, las MDR y las mutaciones con prevalencia baja detectadas por NGS en comparación con la SS, como método de referencia, con el objetivo de acreditar esta plataforma en la rutina clínica del laboratorio de ITS del IPK.

El número de mutaciones totales en ambos fragmentos fue mayor en las secuencias obtenidas por NGS, sin embargo, se detectaron más mutaciones en el fragmento de PR-TI que en de la INT viral. Esto es debido a que el fragmento que codifica para la PR (99 aa) y la RT (335 aa) se secuencia como un único fragmento, porque una proteína se encuentra a continuación de la otra, no siendo así para la INT viral, cuyo fragmento es más pequeño (288 aa). Además, se aprecia que el sistema NGS detectó una mayor cantidad de mutaciones, lo que ha sido publicado con anterioridad y justifica su uso para mostrar cambios en las poblaciones virales presentes en muy bajo porcentaje ⁽¹²¹⁾.

De las once MDR detectadas en el presente estudio, por NGS, ocho estaban presentes por debajo del umbral del 20 %. Según lo descrito por diversos autores ⁽¹²⁶⁻¹²⁸⁾, las plataformas de NGS, aplicadas a los estudios de resistencia ARV del VIH, detectan entre 1,5 y 3 veces más MDR que la secuenciación de Sanger en todos los entornos clínicos, también en individuos sin tratamiento previo con ARV. Los mutantes resistentes a fármacos de baja frecuencia pueden adquirirse a través de la transmisión de persona a persona ^(129, 130) o generarse de *novo* a través de una replicación propensa a errores ⁽¹³¹⁾.

La prevalencia de MDR en sujetos no tratados con ARVs es directamente proporcional a: (a) el tiempo desde la introducción de los diferentes fármacos ARVs y su uso relativo en la población de pacientes; (b) el número de sujetos que desarrollan fracaso virológico a esos fármacos en la población, y (c) la frecuencia de los MDR en sujetos con fracaso virológico, de los cuales las mutaciones pueden transmitirse a pacientes no expuestos a TAR (pacientes “naive”).

Por el contrario, el costo de adaptación conferido por la mutación o mutaciones al virus está inversamente relacionado con la preexistencia de mutantes transmitidos.



Los MDR clínicamente más relevantes en sujetos sin tratamiento serán aquellos que tienen más probabilidades de preexistir antes de la TAR y más probabilidades de reducir la eficacia virológica de los regímenes. Es decir, aquellos que afectan a fármacos con baja barrera genética a la resistencia y con alta prevalencia entre pacientes no tratados. Es importante tener en cuenta que los mismos principios se aplican tanto al método de Sanger como a la NGS. Este último simplemente detecta más mutantes porque tiene una mayor sensibilidad analítica.

Como sucedió en el presente estudio, el mayor número de mutaciones detectadas se observó en la reverso transcriptasa viral afectado en alguna medida a la familia de los inhibidores de la transcriptasa inversa, análogo y no análogos de nucleósido, ya que se ha descrito que las mutaciones observadas con mayor frecuencia en sujetos sin tratamiento antirretroviral están relacionadas con los ITIAN, en particular las TAM (del inglés, *thymidine associated mutations*)^(132, 133) y los ITINAN^(126, 134). El valor clínico de los mutantes resistentes a los ITINAN de baja frecuencia se confirmó en un estudio de casos y controles que incluyó siete cohortes europeas y utilizó la genotipificación centralizada 454⁽¹²⁶⁾.

Los ITIAN e ITINAN han existido durante mucho tiempo, se han utilizado ampliamente, se han prescrito a más personas propensas a desarrollar un fracaso virológico y en condiciones menos óptimas, incluidas la monoterapia secuencial o la terapia dual, y a menudo se asocian a una resistencia emergente cuando se produce un fracaso virológico.

A diferencia de los ITINAN, los estudios no han demostrado ningún valor clínico de la NGS para optimizar la eficacia de la terapia antirretroviral de primera línea potenciada con IP en sujetos que no habían recibido terapia antirretroviral⁽¹³⁵⁾.

Las MDR detectadas fueron escasas, tanto para los IP como para los IINT, lo que se corresponde con lo descrito en la literatura. Según Hofstra y col., las mutaciones primarias que confieren resistencia a los IP son raras en sujetos sin tratamiento antirretroviral. Rara vez se seleccionan durante el fracaso virológico cuando el IP se potencia farmacológicamente y generalmente confieren costos de aptitud significativos al virus, siendo menos fáciles de transmitir⁽¹³⁶⁾. Los inhibidores de la proteasa tienen una alta barrera genética, es decir, se necesitan numerosas mutaciones para desarrollar un impacto



sustancial en la respuesta virológica al tratamiento ⁽¹³⁷⁾. Los virus con múltiples mutaciones de resistencia a los IP rara vez se transmiten ^(136, 138).

También se comenta que la transmisión de la resistencia a los IINT es aún menos frecuente, casi anecdótica ^(91, 139-141). Esta familia se introdujo recientemente, son muy bien tolerados y tienen una posología sencilla, lo que mejora la adherencia al TAR y limita la incidencia de fracaso virológico. Los de segunda generación, como el dolutegravir, además tienen una barrera genética más alta ⁽¹⁴²⁾. Los tratamientos que incluyen inhibidores de la transferencia de la cadena de la integrasa (InSTI o también llamados IINT) se han convertido en la opción preferida para la terapia antirretroviral de primera línea en los muchos países ^(143, 144) porque no son virológicamente inferiores o incluso superiores a otras alternativas, son bien tolerados y a menudo se pueden recetar co-formulados con 2 ITIAN como regímenes de comprimido único (STR).

Los mutantes resistentes a IINT preexistentes, generados espontáneamente, podrían ser seleccionados durante una terapia sub-óptima con IINT ⁽¹⁴⁵⁾. Sin embargo, en un estudio de vigilancia paneuropeo representativo ⁽¹⁴⁰⁾, no se encontraron mutaciones distintivas de ellos circulando en Europa ni mediante secuenciación Sanger ni otras tecnologías empleadas en sujetos que no habían recibido tratamiento ARV en 2006-2007, antes de que se comenzara a recetar IINT.

Se han informado hallazgos similares de otras cohortes europeas ⁽⁹¹⁾. Según este estudio, mientras la resistencia transmitida a los IINT siga siendo clínicamente despreciable, podría no haber necesidad de realizar pruebas de resistencia a la integrasa de referencia en sujetos no tratados con INSTI, ni por Sanger ni por NGS. Sin embargo, dicha recomendación debería revisarse habitualmente de acuerdo con la vigilancia periódica de la transmisión de la resistencia a IINT.

V.2. Indicadores de desempeño de los ensayos de secuenciación comparados

La concordancia entre las secuencias de nucleótidos obtenidas en el presente trabajo, por Sanger y NGS, fue buena, las mayores discrepancias estuvieron relacionadas fundamentalmente a la detección de variantes por NGS por debajo del umbral del método empleado como referencia que fue Sanger, lo que ratifica el uso de la prueba de NGS en



entornos clínicos y reafirma la utilidad. Tzou P. y col., comentaron desde el 2018 que la mayor proporción de ambigüedades de NGS se debe a su umbral más bajo para detectar variantes ⁽²⁷⁾.

Otros estudios han comparado los diferentes protocolos de secuenciación de Sanger para detectar resistencia viral y han encontrado una tasa de concordancia del 99,9 % ⁽¹⁴⁶⁾. Aleman y col., demostraron una alta sensibilidad y especificidad del ensayo de genotipado que ha sido empleado en la presente investigación, para la detección y secuenciación de las múltiples variantes que circulan en la epidemia cubana, lo que reafirma la calidad del ensayo empleado, pero en un entorno diferente porque Aleman y col., utilizaron únicamente la secuenciación de Sanger ⁽¹⁰¹⁾. Los valores de sensibilidad de los ensayos comparados en esta investigación están por encima del 90 %, mientras que los de especificidad están por encima del 85 %, debido a que la prueba de referencia empleada en la comparación fue el método de Sanger y a que las discrepancias encontradas estuvieron en las poblaciones virales presentes por debajo del límite de detección de este ensayo, (20 %). Debido a esto el valor predictivo positivo es bajo, mientras que el negativo es alto ⁽¹⁴⁷⁾.

En comparación con la secuenciación de Sanger, la NGS detectó significativamente más MDR y estimó niveles más altos de resistencia a uno o más ARVs (7/14 de las secuencias de PR-TI y 2/14 de las secuencias de IN). La secuenciación de Sanger suele detectar variantes del VIH-1 presentes en proporciones superiores al 20 %, con un rango del 10 % al 30 %, dependiendo del contexto de nucleótidos ⁽¹⁴⁸⁻¹⁵²⁾. Por el contrario, la proporción en la que la NGS puede detectar variantes depende del umbral seleccionado, aunque en los estudios se han utilizado a menudo umbrales de detección tan bajos como el 1 %, muchos de estos estudios excluyeron muestras con niveles bajos de virus en plasma ^(126, 153-156). Dos estudios recientes por NGS sugirieron utilizar un umbral de detección del 5 % para minimizar los artefactos técnicos ^(157, 158). El umbral de mutaciones más bajo, detectado en el presente estudio fue del 3,63 %. Se detectaron cuatro virus con umbrales por debajo del 5 %, lo que como ya se explicó, no tiene relevancia clínica.

En 2020, el Grupo de Trabajo HIV Res Net de la Organización Mundial de la Salud revisó 103 estudios que evaluaron la prevalencia, la detección y/o la importancia clínica de las MDR en adultos sin tratamiento previo con ARV ⁽¹⁵⁹⁾. El impacto clínico de estas mutaciones



en los regímenes de primera línea se describió en 42 (40,8 %) de los 103 estudios. Se observó una asociación significativa entre MDR previas al tratamiento y el fracaso del tratamiento en 16 estudios, pero no se observó en los 26 estudios restantes. Además, algunas personas con estos cambios aa previos al tratamiento no experimentaron un fracaso a este, y las MDR previas al tratamiento a menudo no se seleccionaron en aquellos que fracasaron ⁽¹⁶⁰⁾.

El estudio “RSPECT” examinó la resistencia general y específica de MDR y su impacto en la terapia antirretroviral y evaluó la discrepancia entre la secuenciación de Sanger y seis umbrales de NGS (1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 % y 20 %). Dependiendo del umbral de NGS, la concordancia entre las dos tecnologías fue del 62 % al 88 % para cualquier MDR. Este estudio señala que la buena concordancia entre las dos tecnologías de secuenciación en umbrales altos de NGS continúa apoyando su uso intercambiable y sugiere el valor añadido de la secuenciación de nueva generación sobre la tecnología existente, menos sensible, para detectar MDR del VIH-1, potencialmente importantes⁽¹¹⁶⁾.

Debido a su extraordinaria sensibilidad, la NGS es propensa a dos tipos de artefactos que ocurren con poca frecuencia durante la secuenciación de Sanger. Los errores de PCR ocurren comúnmente durante la PCR anidada, pero rara vez están presentes en niveles lo suficientemente altos como para ser detectados mediante la secuenciación de Sanger ⁽¹⁶¹⁻¹⁶⁴⁾. Por el contrario, NGS detecta errores de PCR si el umbral de detección se establece demasiado bajo. De hecho, si el número de plantillas de ADNc amplificables es bajo, debido a una CV baja y/o extracción de ARN, transcripción inversa o PCR ineficientes, entonces gran parte de la variabilidad observada en una secuencia obtenida por NGS representará un error de PCR ^(162, 163, 165). De hecho, los ensayos que utilizan la identificación del cebador, también conocida como *Primer ID*, que agrega una etiqueta única a cada molécula de ADNc, muestran que la profundidad de la NGS no conduce necesariamente a la detección confiable de variantes de baja frecuencia ^(162, 166, 167).

A pesar de que en el presente estudio se describen más mutaciones mediadas por APOBEC en la NGS que en el método de Sanger, ninguna de ellas estuvo ligada a cambios aa relacionados con resistencia viral. La NGS también tiene más probabilidades que la secuenciación de Sanger de detectar hipermutación de G por A, mediada por APOBEC,



presentes en bajas proporciones, particularmente en muestras contaminadas con ADN proviral ⁽¹⁶⁸⁻¹⁷⁰⁾. Es poco probable que los virus hipermutados sean funcionales y no se ha demostrado que contribuyan al fracaso virológico ⁽¹⁶⁸⁻¹⁷¹⁾. Hay 13 MDR que pueden ser causados por hipermutación mediada por APOBEC, incluidas D30N, M46I y G73S en PR; D67N, E138K, M184I, G190SE y M230I en RT; y E138K, G118R y G163KR en IN. Es necesario determinar si una secuencia contiene una hipermutación de G por A, mediada por APOBEC, para interpretar la importancia de estas MDR. La presencia de una gran cantidad de mutaciones muy inusuales, por encima de un umbral, sugiere que el umbral es demasiado bajo y que algunas de las mutaciones de baja frecuencia son errores del PCR. Del mismo modo, la presencia de un gran número de mutaciones características de APOBEC, por encima de un umbral, sugiere que las MDR que pueden ser causadas por hipermutación mediada por APOBEC pueden no reflejar la presión de selección del ARV.

En las secuencias virales estudiadas, identificamos tres con evidencia de una hipermutación de G por A, mediada por APOBEC en PR-TI y cuatro en IN, mientras que 11 tuvieron un número ligeramente mayor de mutaciones inusuales en PR-TI y ocho en la IN por NGS. La detección relativamente poco frecuente de mutaciones características de APOBEC y mutaciones inusuales mostradas por NGS, en este estudio, es tal vez consistente con las características de los pacientes estudiados.

Las secuencias obtenidas mediante la metodología de Sanger en los ensayos de genotipado, comerciales y caseros, son editadas por profesionales con experiencia en este trabajo, por lo que no es usual detectar deleciones, codones de parada o inserciones, mientras que aquellas obtenidas por los ensayos de NGS son editadas por programas bioinformáticos. Estas plataformas, además pueden amplificar poblaciones virales defectivas, en las que estos errores pueden ser frecuentes ⁽¹⁷²⁾.

Las MDR de baja frecuencia incluyen aquellas que alguna vez fueron dominantes en la población de virus de un individuo, como resultado de una resistencia transmitida o adquirida, pero que en ausencia de presión farmacológica, fueron superados por variantes más adaptadas ^(25, 173, 174) y aquellas que surgieron bajo presión selectiva del fármaco pero que no han alcanzado niveles detectables mediante la secuenciación de Sanger ^(168, 175). En el presente estudio las muestras fueron obtenidas de individuos recién diagnosticados con



un número mayor de MDR únicas detectadas mediante NGS que por Sanger, consistente con la explicación anterior.

La evidencia más sólida de la importancia clínica de las MDR de baja frecuencia ha sido para los antagonistas del correceptor CXCR5 y los ITINAN ⁽¹⁷⁶⁾. Un metanálisis y dos estudios posteriores de casos y controles y de cohorte demuestran que las MDR a los ITINAN, de baja frecuencia, se asocian con un mayor riesgo de fracaso virológico en un régimen de primera línea de tratamiento que contiene ITINAN ^(126, 134, 177). El estudio de cohorte mostró un mayor riesgo de fracaso virológico asociado con variantes de baja frecuencia presentes en niveles superiores al 5 %, pero no en niveles inferiores ⁽¹⁷⁷⁾. No se ha demostrado que las MDR secundarias de baja frecuencia asociadas a IP reduzcan la respuesta a un régimen de primera línea que contenga ATV potenciado con ritonavir o DRV potenciado con ritonavir ⁽¹⁷⁸⁾.

Las MDR de baja frecuencia se han asociado con un mayor riesgo de fracaso virológico en un estudio retrospectivo de terapia de rescate ⁽¹⁵³⁾ y en otro estudio igualmente demostraron una tendencia hacia un mayor fracaso virológico donde se usó como terapia de rescate la potente combinación de darunavir potenciado con ritonavir, raltegravir y etravirina ⁽¹⁷⁹⁾. Las MDR de baja frecuencia también parecen tener más probabilidades de ser clínicamente significativas en pacientes con un historial de tratamiento compatible con la MDR, posiblemente porque en este contexto es menos probable que las MDR de baja frecuencia sean artefactos y más probabilidades de estar relacionadas con mutaciones compensatorias ^(156, 180, 181).

Además, *Vela Diagnostics* afirmó la detección efectiva de variantes con una frecuencia del 5 % para muestras con una carga viral >1000 copias/mL, de manera similar a otras tecnologías de NGS explotadas con fines de investigación ⁽¹⁵⁷⁾

La plataforma comercializada por *Vela Diagnostics* apunta a una importante automatización en varios pasos prácticos y procedimientos de extracción de datos para proporcionar los resultados de las pruebas de genotipado y resistencia del VIH. El nivel de automatización de la extracción, amplificación y creación de bibliotecas de plantillas del ARN del VIH sigue creciendo, de modo que el paso de PCR en emulsión del ensayo original ahora ha sido reemplazado por una fase de PCR isotérmica más eficiente. Además, el paso de carga



manual del chip se ha integrado en un instrumento robótico de manipulación de líquidos que también dispensa reactivos de PCR. También se montó una cámara en el nuevo instrumento Sentosa® SX101. Todos estos ajustes apuntan a reducir la variabilidad, que de otro modo sería difícil de controlar en un flujo de trabajo complejo, que involucra varios pasos prácticos y tareas instrumentales. Así, el logro de un importante nivel de automatización jugará un papel clave en la difusión de la plataforma Vela *Diagnosics* NGS en los laboratorios locales. Hoy en día, este sistema semiautomático ha sido certificado para su uso en el diagnóstico en varios países: EE. UU, Europa, Australia, Tailandia y Japón.

Es esencial optimizar y estandarizar la extracción de datos y las operaciones de informes automáticos para lograr conclusiones clínicas significativas. Las actualizaciones de algoritmos (es decir, la última versión de VIHdb) deben implementarse en todos los servidores de Sentosa® SQ *Reporter*; de lo contrario, habrá riesgo de sesgo entre los resultados de los análisis basados en versiones de bases de datos más antiguas y aquellos basados en las más actualizadas. Sin embargo, estas ventajas no deberían llevar a la idea de que los informes automáticos obtenidos podrían entregarse directamente a los médicos de asistencia, sin la interpretación cuidadosa de un operador capacitado. De hecho, los informes automatizados conllevan el riesgo de sacar conclusiones completamente engañosas a partir de artefactos técnicos; por lo tanto, se recomienda encarecidamente inspeccionar de forma cuidadosa las variantes de baja frecuencia (menos del 5 %), así como las asociadas con mutaciones APOBEC, para distinguir entre artefactos del PCR y mutaciones reales. El historial de tratamiento del paciente siempre debe utilizarse para respaldar la aparición razonable de resistencia a los medicamentos bajo la presión del tratamiento. El ensayo de genotipado del VIH Sentosa® SQ evaluado tiene las ventajas de reducir el tiempo de práctica y los riesgos infecciosos para los operadores, al tiempo que proporciona resultados clínicos útiles. Con optimizaciones esenciales adicionales, el sistema NGS de Vela *Diagnosics* hará una contribución sustancial en la lucha mundial contra la propagación de la resistencia a los medicamentos contra el VIH.



V.3. Subtipos virales

El estudio de subtipos y formas recombinantes es de gran importancia ya que permite conocer la distribución global de las variantes genéticas del VIH y el impacto de la diversidad del VIH en la patogénesis, la transmisión y el manejo clínico ⁽⁶⁹⁾. La variabilidad genética puede influir en el rendimiento de las pruebas de determinación de la CV y de la resistencia a los ARVs ⁽¹⁸²⁾. La distribución de subtipos y formas recombinantes del VIH-1 ha cambiado en el tiempo a nivel global, regional y de país; impactando en la epidemiología y control del VIH-1 ⁽⁶⁴⁾.

Los subtipos más frecuentes detectados en el presente estudio, en PR-TI fueron las formas únicas recombinantes, seguidas por la CRF_BGs, la CRF19_cpx, el subtipo B, la CRF18_cpx y el subtipo C; mientras que en la INT viral los subtipos más frecuentes detectados fueron las formas recombinantes circulante BGs y subtipo B, seguida por la CRF18_cpx, CRF19_cpx y URF y por último el subtipo C.

En el mundo, los subtipos A y D se han descrito de forma estable en el tiempo, o sea la frecuencia de ambos subtipos no ha sufrido variaciones significativas de un año al siguiente ⁽⁶⁴⁾. El subtipo A se ha detectado con mayor prevalencia en el Este de África y Rusia, mientras que los mayores valores del subtipo D se han encontrado en África, llegando a superar el 40 % ⁽¹⁸³⁾.

El subtipo C se ha reportado con valores de frecuencia superiores a 90 % en el Sur de África, India y en el sur de Brasil ⁽¹⁸⁴⁾. El subtipo G se halla en mayores porcentajes (33,1 %) en el Este de África. Por su parte, el subtipo F es característico de África Central y América Latina, aunque con valores menores que el resto de los subtipos, oscilando desde 3,4 hasta 7,8 %, así como el subtipo H que circula con porcentajes de 3,2 hasta 9,1 % en el centro de África y en menor medida en el Caribe, Europa y Asia ⁽⁶³⁾. En el presente estudio, solo se detectó el subtipo C en un 3,6 % y no se encontraron el resto de los subtipos puros que en otros estudios se han detectado, lo que denota su escasa circulación en Cuba. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Pérez y colaboradores y Machado y colaboradores ^(12, 71).

El subtipo B del VIH-1 se reconoce como el más prevalente en la región de las Américas, Europa y Oceanía ⁽¹⁸³⁾. Comparando los valores de frecuencia del este subtipo con lo



reportado en el continente americano, es evidente su menor circulación en Cuba. Estudios realizados en Estados Unidos entre los años 2017 y 2019 evidencian una elevada frecuencia de aparición del subtipo B con cifras de 93,3 % ⁽¹⁸⁵⁾ y 93,6 %, respectivamente ⁽¹⁸⁶⁾. Por su parte, la región de América Latina exhibe resultados similares, por ejemplo, en Panamá se detecta el subtipo B en 98,9 % ⁽¹⁸⁷⁾, Brasil con 72 % ⁽¹⁸⁸⁾, México en valores de 98,6 % ⁽¹⁸⁹⁾ y Bolivia con un 72,5 % ⁽¹⁹⁰⁾. El continente europeo muestra también elevadas frecuencias de circulación del subtipo B del VIH-1, como se verifica en un estudio multicéntrico que incluye a ocho países europeos y la frecuencia de aparición del subtipo B es de 74 % ⁽¹⁹¹⁾.

Es interesante la menor circulación del subtipo B en Cuba, en comparación con países vecinos y del continente europeo, así como la gradual disminución de dicho subtipo en Cuba a través de los años. Esto último se verificó en estudios cubanos realizados en varios periodos, por ejemplo, un estudio realizado en 1999 identificó un 48 % del subtipo B ⁽⁷²⁾, en 2003 se obtuvo un 41,2 % ⁽¹²⁾, en el período 2009 a 2014 la frecuencia de este subtipo fue de 30,9 %, mientras que en el presente estudio es la mitad de esa cifra (14,3 %).

Al analizar las formas genéticas no-B, en el presente estudio, se verificó la superioridad de este grupo sobre el subtipo B en los fragmentos secuenciados, y en particular las URFs en PR-TI se mostraron como las más frecuentes.

El incremento en la circulación de las CRFs y URFs ha sido notorio en los últimos años a nivel mundial ^(63, 183). Se han identificado recombinantes específicos por regiones, tal es la CRF01_AE con una elevada frecuencia en el continente asiático ^(192, 193) y la CRF02_AG en el este de África ^(194, 195). En el caso de las CRF07_BC, CRF08_BC y CRF35_AB se han identificado en China e Irán con baja periodicidad ⁽¹⁹⁶⁻¹⁹⁸⁾. Un estudio en China donde se analizó la prevalencia y la distribución geográfica del VIH-1 en HSH, determinó la CRF01_AE como el subtipo más prevalente con 57,36 % ^(199, 200). En España, la prevalencia de los recombinantes BF era baja, sin embargo, comenzó a incrementarse en HSH ^(60, 183, 201). En dicho país, en Madrid comenzó un brote de CRF02_AG, recombinante que coincide con el más prevalente en el Este de África y que se extendió a otras regiones de España donde se reportaron frecuencias de circulación cercanas al 52 %, lo cual se atribuyó a la transmisión en grupos de riesgo como los HSH ⁽²⁰²⁾. Otro estudio en Camerún reveló que la frecuencia de circulación del CRF02_AG es de 74,1 % ⁽²⁰³⁾.



En Cuba las formas recombinantes circulantes más frecuentes son CRFs_BG, CRF19_cpx y CRF18_cpx ⁽²⁶⁾. La frecuencia de circulación de las formas recombinantes se ha incrementado en los últimos años, tal y como ocurrió a nivel mundial. En el 2006 se confirmó la elevada diversidad genética del VIH-1, la frecuente recombinación y la reciente expansión del recombinante BG en el país. Las frecuencias de recombinantes fueron 18,4 %, 11,6 %, 7,1 % de CRF19_cpx, CRFs_BG y CRF18_cpx, respectivamente ⁽¹²⁾. Otro estudio realizado por Pérez y colaboradores en el 2013 encontró frecuencias con valores que oscilan entre 19,5 % para las CRF_BG, 18 % para las CRF19_cpx y 10,3 % para las CRF18_cpx ⁽²⁰⁴⁾. En el período 2009-2014 los valores de frecuencias oscilaron entre 9,8 % para la CRF18_cpx, 18,3 % para la CRF19_cpx y 22 % para las CRFs_BG ⁽²⁶⁾. Las frecuencias de los recombinantes circulantes en el presente estudio se mantuvieron en el rango de las descritas en estudios anteriores realizados en Cuba.

Los resultados antes descritos ratifican la considerable diversidad genética del VIH-1 en Cuba, lo que se atribuye al origen de la epidemia cubana de VIH a partir de pacientes infectados en África Central, durante la década del 70-80 ^(8, 10, 12).

Se plantea que la expansión de las diferentes formas recombinantes en las epidemias del VIH-1 en el mundo puede ocurrir por la adecuación evolutiva de los recombinantes con respecto a los subtipos puros ^(205, 206) o por las conductas sexuales ⁽²⁰²⁾. En Cuba también se pensó en la posibilidad de una mayor adecuación evolutiva dada por una mayor capacidad replicativa y eficiencia de transmisión de las CRF_BG (20, 23, 24) ⁽¹²⁾. En el año 2015, Kourí y colaboradores informaron que la forma recombinante CRF19_cpx presenta una alta adecuación evolutiva y se asocia con una progresión rápida a sida en pacientes cubanos ⁽⁵⁹⁾. Este resultado confirma la importancia de la vigilancia de la variabilidad genética del VIH-1 en Cuba.

Nájera y col., en un artículo publicado en la década del 2000 diserta sobre el sub-registro de URFs en zonas donde circulan a la vez múltiples subtipos y CRFs, así como la posibilidad de generar nuevas formas genéticas en aquellas poblaciones donde esto ocurre ⁽³⁵⁾. Este fenómeno coincide con lo observado en la epidemia cubana de VIH, donde circulan gran cantidad de variantes genéticas, por lo que es de esperar el incremento de las URF en Cuba. Este resultado además advierte sobre la importancia de secuenciar más de un gen del



VIH para obtener resultados más precisos al realizar estudios de epidemiología molecular en el país.

Las URF son recombinantes únicos sin evidencia de transmisión posterior. La proporción de estos recombinantes ha aumentado con el tiempo, tanto a nivel mundial como en la mayoría de las regiones, y ahora constituyen casi una cuarta parte de todas las infecciones por VIH-1 a nivel mundial ⁽³⁵⁾. Además de aumentar la complejidad genética de la pandemia del VIH, la recombinación puede conferir ventaja evolutiva, lo que lleva a una transmisión y/o virulencia alteradas ⁽²⁰⁷⁻²⁰⁹⁾.

Se vuelve a observar en el presente estudio que el virus CRF18_cpx fue el más representado formando parte de las URF (6/10, 60,3 %). Las URFs más frecuente fueron la combinación de CRF18_cpx/CRF19_cpx y CRF18_cpx/B (3 de cada una). Estos resultados concuerdan con lo publicado por Machado y colaboradores, los que encontraron que la URF CRF18_cpx/CRF19_cpx fue la más frecuente en pacientes recién diagnosticados con VIH entre los años 2013 y 2014 ⁽²¹⁰⁾.

El aumento de las formas recombinantes tiene un gran impacto en Cuba y a nivel mundial, ya que puede influir en el diagnóstico preciso de VIH, en el desarrollo de candidatos vacunales, en la diversidad genética, en la evolución y en la resistencia ARV.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES



VI. CONCLUSIONES

- ✓ Es la primera evaluación clínica del ensayo de genotipado del VIH Sentosa SQ en el país. El NGS parece ser una herramienta prometedora para la detección y cuantificación de DRM en pacientes infectados con VIH-1.
- ✓ El análisis revela mutaciones específicas detectadas exclusivamente por Vela NGS, en la región que codifica para la PR-RT e INT, lo que destaca su eficacia en la identificación de diversas mutaciones críticas para la selección del tratamiento y el manejo del paciente.
- ✓ Las medias en los niveles de resistencia a cada fármaco no se vieron afectados por las diferencias en las mutaciones únicas detectadas por cada método de secuenciación estudiado.
- ✓ Se confirma la diversidad genética del VIH-1 en Cuba, con expansión significativa de las formas únicas recombinantes.
- ✓ Estos hallazgos subrayan la utilidad clínica del sistema Vela NGS para avanzar en la atención del VIH, ofreciendo una sensibilidad de detección mejorada y un flujo de trabajo optimizado para mejorar los resultados del paciente

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES



VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar un estudio similar con mayor número de muestras y en pacientes tratados.
- ✓ Realizar secuenciación de genoma completo con vistas a detectar nuevas formas recombinantes circulantes.
- ✓ Optimizar y estandarizar la extracción de datos y las operaciones de informes automáticos para lograr conclusiones clínicas significativas. Deben implementarse las actualizaciones de algoritmos en todos los servidores de Sentosa® SQ Reporter.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bonifacio MA, Genchi C, Lagioia A, Talamo V, Volpe A, Marigliò MA. Analytical Assessment of the Vela Diagnostics NGS Assay for HIV Genotyping and Resistance Testing: The Apulian Experience. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(5).
2. ONUSIDA. Hoja informativa. Estadísticas mundiales sobre el VIH 2024 [9 sep 2024]. Disponible en: <https://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>.
3. Barouch DH, Whitney JB, Moldt B, Klein F, Oliveira TY, Liu J, et al. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature*. 2013;503(7475):224-8.
4. Lemoine F, Correia D, Lefort V, Doppelt-Azeroual O, Mareuil F, Cohen-Boulakia S, et al. NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic Acids Research*. 2019;47.
5. Aldrich C, Hemelaar J. Global HIV-1 diversity surveillance. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(12):691-4.
6. Gorry C. Cuba's National HIV/AIDS Program. *MEDICC*. 2011;13(No 2).
7. Perez J, Perez D, Gonzalez I, Diaz Jidy M, Orta M, Aragonés C, et al. Approaches to the management of HIV-AIDS in Cuba. 2004.
8. Thomson MM, Nájera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS reviews*. 2005;7(4):210-24.
9. Delatorre E, Bello G. Phylodynamics of the HIV-1 epidemic in Cuba. *PloS one*. 2013;8(9):e72448.
10. Casado G, Thomson MM, Sierra M, Nájera R. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19_cpx) in Cuba. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2005;40(5):532-7.
11. Sierra M, Thomson MM, Posada D, Pérez L, Aragonés C, González Z, et al. Identification of 3 phylogenetically related HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant forms in Cuba. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2007;45(2):151-60.



12. Pérez L, Thomson MM, Bleda MJ, Aragonés C, González Z, Pérez J, et al. HIV Type 1 molecular epidemiology in Cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms. *AIDS research and human retroviruses*. 2006;22(8):724-33.
13. Kouri V, Khouri R, Alemán Y, Abrahantes Y, Vercauteren J, Pineda-Peña AC, et al. CRF19_cpx is an Evolutionary fit HIV-1 Variant Strongly Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine*. 2015;2(3):244-54.
14. Richman D, Rosenthal AS, Skoog M, Eckner RJ, Chou TC, Sabo JP, et al. BI-RG-587 is active against zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 and synergistic with zidovudine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1991;35(2):305-8.
15. NIH. HIV Overview. FDA-Approved HIV Medicines 2023 [updated 23/03/202301/04/2024]. Disponible en: <https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/fda-approved-hiv-medicines>.
16. ONUSIDA. Un nuevo informe de ONUSIDA demuestra que el sida puede acabar antes del 2030 y describe el camino para conseguirlo 2023 [updated 13/07/202301/04/2024]. Disponible en: <https://www.unaids.org/es/resources/presscentre/pressreleaseandstatementarchive/2023/july/unaids-global-aids-update>.
17. Bárcena A, Cimoli M, García-Buchaca R, Yáñez L, Pérez R. La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible Una oportunidad para América Latina y el Caribe. Naciones Unidas, Santiago Naciones Unidas, CEPAL; 2018.
18. Casadellà M, Paredes R. Deep sequencing for HIV-1 clinical management. *Virus research*. 2017;239:69-81.
19. WHO. Global action plan on HIV drug resistance 2017-2021 2022 [Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255883>].
20. Weber J, Volkova I, Sahoo MK, Tzou PL, Shafer RW, Pinsky BA. Prospective Evaluation of the Vela Diagnostics Next-Generation Sequencing Platform for HIV-1 Genotypic Resistance Testing. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2019;21(6):961-70.



21. Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Milena Gómez A, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*. 2020;61(2):49-63.
22. Kyeyune F, Gibson RM, Nankya I, Venner C, Metha S, Akao J, et al. Low-frequency drug resistance in HIV-infected Ugandans on antiretroviral treatment is associated with regimen failure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(6):3380-97.
23. Stella-Ascariz N, Arribas JR, Paredes R, Li JZ. The role of HIV-1 drug-resistant minority variants in treatment failure. *The Journal of infectious diseases*. 2017;216(suppl_9):S847-S50.
24. Swenson LC, Mo T, Dong WW, Zhong X, Woods CK, Jensen MA, et al. Deep Sequencing to Infer HIV-1 Co-Receptor Usage: Application to Three Clinical Trials of Maraviroc in Treatment-Experienced Patients. *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(2):237-45.
25. Castro H, Pillay D, Cane P, Asboe D, Cambiano V, Phillips A, et al. Persistence of HIV-1 Transmitted Drug Resistance Mutations. *The Journal of infectious diseases*. 2013;208(9):1459-63.
26. Alemán-Campos Y, Kourí-Cordellá V, Pérez-Santos L, Fonseca-Gómez C, Pérez-Ávila J, Ortega-González LM, et al. HIV-1 Antiretroviral Resistance in Cuba, 2009-2014. *MEDICC review*. 2018;20(3):15-21.
27. Tzou Philip L, Ariyaratne P, Varghese V, Lee C, Rakhmanaliev E, Villy C, et al. Comparison of an In Vitro Diagnostic Next-Generation Sequencing Assay with Sanger Sequencing for HIV-1 Genotypic Resistance Testing. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(6):10.1128/jcm.00105-18.
28. Greene WC. A history of AIDS: looking back to see ahead. *European journal of immunology*. 2007;37 Suppl 1:S94-102.
29. Freed EO, Martin MA. Human Immunodeficiency Viruses: Replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. 6th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1502-60
30. Delgado R. Características virológicas del VIH. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2011;29(1):58-65.



31. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science (New York, NY)*. 1986;233(4761):343-6.
32. Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*. 1990;345(6273):356-9.
33. Gao F, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Hanson AP, et al. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature*. 1992;358(6386):495-9.
34. Freed EO, Gale M, Jr. Antiviral innate immunity: editorial overview. *J Mol Biol*. 2014;426(6):1129-32.
35. Najera R, Delgado E, Perez-Alvarez L, Thomson MM. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS (London, England)*. 2002;16 Suppl 4:S3-16.
36. Sexually Transmitted Diseases and AIDS. *Biology of Humans* [21/05/2024]. Disponible en: <http://schoolbag.info/biology/humans/24.html>.
37. Spector C, Mele AR, Wigdahl B, Nonnemacher MR. Genetic variation and function of the HIV-1 Tat protein. *Medical microbiology and immunology*. 2019;208(2):131-69.
38. Raja R, Ronsard L, Lata S, Trivedi S, Banerjea AC. HIV-1 Tat potently stabilises Mdm2 and enhances viral replication. *The Biochemical journal*. 2017;474(14):2449-64.
39. Coffin JM. HIV viral dynamics. *AIDS (London, England)*. 1996;10 Suppl 3:S75-84.
40. Alcamí J, Coiras M. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2011;29(3):216-26.
41. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. 1996;85(7):1135-48.
42. Fenyö EM, Morfeldt-Månson L, Chiodi F, Lind B, von Gegerfelt A, Albert J, et al. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *Journal of virology*. 1988;62(11):4414-9.



43. Koot M, Vos AH, Keet RP, de Goede RE, Dercksen MW, Terpstra FG, et al. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS (London, England)*. 1992;6(1):49-54.
44. Sullivan N, Sun Y, Li J, Hofmann W, Sodroski J. Replicative function and neutralization sensitivity of envelope glycoproteins from primary and T-cell line-passaged human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Journal of virology*. 1995;69(7):4413-22.
45. Collman R, Balliet JW, Gregory SA, Friedman H, Kolson DL, Nathanson N, et al. An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*. 1992;66(12):7517-21.
46. Hoffman C, Rockstroh JK. HIV 2022/2023 Hamburg. Germany2022 []. Disponible en: <https://www.hivbuch.de/>.
47. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Annals of internal medicine*. 1996;124(7):654-63.
48. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. 1993;362(6418):355-8.
49. CDC. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports*. 1992;41(Rr-17):1-19.
50. Liu SL, Schacker T, Musey L, Shriner D, McElrath MJ, Corey L, et al. Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses. *Journal of virology*. 1997;71(6):4284-95.
51. Howley PM, Knipe DM. *Fields Virology*. 7 ed. United States of America: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2024.
52. Masur H, Ognibene FP, Yarchoan R, Shelhamer JH, Baird BF, Travis W, et al. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Annals of internal medicine*. 1989;111(3):223-31.



53. Korenromp EL, Williams BG, Schmid GP, Dye C. Clinical prognostic value of RNA viral load and CD4 cell counts during untreated HIV-1 infection--a quantitative review. *PloS one*. 2009;4(6):e5950.
54. Tee KK, Thomson MM, Hemelaar J. Editorial: HIV-1 genetic diversity, volume II. *Frontiers in microbiology*. 2022;13:1007037.
55. Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *British medical bulletin*. 2001;58:19-42.
56. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science (New York, NY)*. 2000;288(5463):55-6.
57. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine*. 2009;15(8):871-2.
58. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *The New England journal of medicine*. 2008;358(15):1590-602.
59. Kouri V, Khouri R, Aleman Y, Abrahantes Y, Vercauteren J, Pineda-Pena AC, et al. CRF19_cpx is an Evolutionary fit HIV-1 Variant Strongly Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine*. 2015;2(3):244-54.
60. Patiño-Galindo J, Torres-Puente M, Bracho MA, Alastrué I, Juan A, Navarro D, et al. Identification of a large, fast-expanding HIV-1 subtype B transmission cluster among MSM in Valencia, Spain. *PloS one*. 2017;12(2):e0171062.
61. Vuilleumier S, Bonhoeffer S. Contribution of recombination to the evolutionary history of HIV. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2015;10(2):84-9.
62. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(3):182-92.
63. Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Fleminger I, Kirtley S, et al. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *The Lancet Infectious diseases*. 2019;19(2):143-55.
64. Hemelaar J, Loganathan S, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Kirtley S. Country Level Diversity of the HIV-1 Pandemic between 1990 and 2015. *Journal of virology*. 2020;95(2).



65. Ariën KK, Vanham G, Arts EJ. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nature reviews Microbiology*. 2007;5(2):141-51.
66. Tebit DM, Arts EJ. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *The Lancet Infectious diseases*. 2011;11(1):45-56.
67. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science (New York, NY)*. 2014;346(6205):56-61.
68. Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5577):2354-60.
69. Hemelaar J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *The Journal of infection*. 2013;66(5):391-400.
70. Blanco M, Machado LY, Díaz H, Ruiz N, Romay D, Silva E. HIV-1 Genetic Variability in Cuba and Implications for Transmission and Clinical Progression. *MEDICC review*. 2015;17(4):25-31.
71. Machado LY, Blanco M, Dubed M, Diaz HM, Ruiz NM, Valdes N, et al. HIV type 1 genetic diversity in newly diagnosed Cuban patients. *AIDS research and human retroviruses*. 2012;28(8):956-60.
72. Cuevas MT, Ruibal I, Villahermosa ML, Díaz H, Delgado E, Parga EV, et al. High HIV-1 genetic diversity in Cuba. *AIDS (London, England)*. 2002;16(12):1643-53.
73. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *The New England journal of medicine*. 2011;365(6):493-505.
74. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, Vernazza P, Collins S, Degen O, et al. Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *Lancet (London, England)*. 2019;393(10189):2428-38.
75. Bavinton BR, Jin F, Prestage G, Zablotska I, Koelsch KK, Phanuphak N, et al. The Opposites Attract Study of viral load, HIV treatment and HIV transmission in



- serodiscordant homosexual male couples: design and methods. *BMC public health*. 2014;14:917.
76. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, Vernazza P, Collins S, van Lunzen J, et al. Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy. *Jama*. 2016;316(2):171-81.
77. Frescura L, Godfrey-Faussett P, Feizzadeh AA, El-Sadr W, Syarif O, Ghys PD. Achieving the 95 95 95 targets for all: A pathway to ending AIDS. *PloS one*. 2022;17(8):e0272405.
78. Aquaro S, Borrajo A, Pellegrino M, Svicher V. Mechanisms underlying of antiretroviral drugs in different cellular reservoirs with a focus on macrophages. *Virulence*. 2020;11(1):400-13.
79. Perno CF, Svicher V, Ceccherini-Silberstein F. Novel drug resistance mutations in HIV: recognition and clinical relevance. *AIDS reviews*. 2006;8(4):179-90.
80. Smith SJ, Zhao XZ, Burke TR, Jr., Hughes SH. Efficacies of Cabotegravir and Bictegravir against drug-resistant HIV-1 integrase mutants. *Retrovirology*. 2018;15(1):37.
81. Chen R, Quinones-Mateu ME, Mansky LM. HIV-1 mutagenesis during antiretroviral therapy: implications for successful drug treatment. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2005;10:743-50.
82. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs*. 2012;72(9):e1-25.
83. Bartmeyer B, Kuecherer C, Houareau C, Werning J, Keeren K, Somogyi S, et al. Prevalence of transmitted drug resistance and impact of transmitted resistance on treatment success in the German HIV-1 Seroconverter Cohort. *PloS one*. 2010;5(10):e12718.
84. Lobritz MA, Ratcliff AN, Marozsan AJ, Dudley DM, Tilton JC, Arts EJ. Multifaceted mechanisms of HIV inhibition and resistance to CCR5 inhibitors PSC-RANTES and Maraviroc. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(6):2640-50.
85. Zhuang M, Vassell R, Yuan C, Keller P, Ling H, Wang W, et al. Mutations That Increase the Stability of the Postfusion gp41 Conformation of the HIV-1 Envelope Glycoprotein Are Selected by both an X4 and R5 HIV-1 Virus To Escape Fusion



Inhibitors Corresponding to Heptad Repeat 1 of gp41, but the gp120 Adaptive Mutations Differ between the Two Viruses. *Journal of virology*. 2019;93.

86. Luu QP, Dean J, Do TTD, Carr MJ, Dunford L, Coughlan S, et al. HIV type 1 coreceptor tropism, CCR5 genotype, and integrase inhibitor resistance profiles in Vietnam: implications for the introduction of new antiretroviral regimens. *AIDS research and human retroviruses*. 2012;28 10:1344-8.
87. Gulick RM, Flexner C. Long-Acting HIV Drugs for Treatment and Prevention. *Annual review of medicine*. 2019;70:137-50.
88. Anstett K, Brenner B, Mesplède T, Wainberg MA. HIV-1 Resistance to Dolutegravir Is Affected by Cellular Histone Acetyltransferase Activity. *Journal of virology*. 2017;91(21).
89. Cooper DA, Steigbigel RT, Gatell JM, Rockstroh JK, Katlama C, Yeni P, et al. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. *The New England journal of medicine*. 2008;359(4):355-65.
90. Canducci F, Marinozzi MC, Sampaolo M, Boeri E, Spagnuolo V, Gianotti N, et al. Genotypic/phenotypic patterns of HIV-1 integrase resistance to raltegravir. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(3):425-33.
91. Doyle T, Dunn DT, Ceccherini-Silberstein F, De Mendoza C, Garcia F, Smit E, et al. Integrase inhibitor (INI) genotypic resistance in treatment-naive and raltegravir-experienced patients infected with diverse HIV-1 clades. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(11):3080-6.
92. Omar YM, Abdu-Allah HHM, Abdel-Moty SG. Synthesis, biological evaluation and docking study of 1,3,4-thiadiazole-thiazolidinone hybrids as anti-inflammatory agents with dual inhibition of COX-2 and 15-LOX. *Bioorganic chemistry*. 2018;80:461-71.
93. Tang MW, Liu TF, Shafer RW. The HIVdb system for HIV-1 genotypic resistance interpretation. *Intervirology*. 2012;55(2):98-101.
94. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7.
95. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(2):560-4.



96. Church DL, Cerutti L, Gürtler A, Griener T, Zelazny A, Emler S. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*. 2020;33(4).
97. López C, González F, Carmona M, Oliver A. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. In: Oliver A, Cercenado E, Cantón R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2021.
98. Santamaría M, Lezana J. Técnicas de secuenciación masiva (NGS). *Ed Cont Lab Clin*. 2018;37:33 - 40.
99. Rubio S P-OR, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universidad Medica*. 2020;61.
100. Fuster E. Desarrollo y validación de un test genético preconcepcional mediante secuenciación masiva. [Licenciatura]: Universidad Miguel Hernández; 2017.
101. Aleman Y, Vinken L, Kouri V, Perez L, Alvarez A, Abrahantes Y, et al. Performance of an in-house human immunodeficiency virus type 1 genotyping system for assessment of drug resistance in Cuba. *PLoS one*. 2015;10(2).
102. Van Laethem K, Schrootena Y, Lemeya P, Van Wijngaerdena E, De Witb S, Van Ransta M, et al. A genotypic resistance assay for the detection of drug resistance in the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene. *Elsevier BV*. 2005;123.
103. Pimentel V, Pingarilho M, Sebastião CS, Miranda M, Gonçalves F, Cabanas J, et al. Applying Next-Generation Sequencing to Track HIV-1 Drug Resistance Mutations Circulating in Portugal. *Viruses*. 2024;16(4).
104. Parkin NT, Avila-Rios S, Bibby DF, Brumme CJ, Eshleman SH, Harrigan PR, et al. Multi-Laboratory Comparison of Next-Generation to Sanger-Based Sequencing for HIV-1 Drug Resistance Genotyping. *Viruses*. 2020;12(7):694.
105. Cantín M. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human subjects. Reviewing the Latest Version. *International Journal of Medical and Surgical Sciences*. 2018;1:339-46.
106. van Delden JJ, van der Graaf R. Revised CIOMS International Ethical Guidelines for Health-Related Research Involving Humans. *Jama*. 2017;317(2):135-6.



107. Mohamed S, Penaranda G, Gonzalez D, Camus C, Khiri H, Boulmé R, et al. Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure. *AIDS (London, England)*. 2014;28(9):1315-24.
108. Stella-Ascariz N, Arribas JR, Paredes R, Li JZ. The Role of HIV-1 Drug-Resistant Minority Variants in Treatment Failure. *The Journal of infectious diseases*. 2017;216(suppl_9):S847-s50.
109. Fokam J, Bellocchi MC, Armenia D, Nanfack AJ, Carioti L, Continenza F, et al. Next-generation sequencing provides an added value in determining drug resistance and viral tropism in Cameroonian HIV-1 vertically infected children. *Medicine*. 2018;97(13):e0176.
110. Noguera-Julian M, Edgil D, Harrigan PR, Sandstrom P, Godfrey C, Paredes R. Next-Generation Human Immunodeficiency Virus Sequencing for Patient Management and Drug Resistance Surveillance. *The Journal of infectious diseases*. 2017;216(suppl_9):S829-S33.
111. Arias A, López P, Sánchez R, Yamamura Y, Rivera-Amill V. Sanger and Next Generation Sequencing Approaches to Evaluate HIV-1 Virus in Blood Compartments. *International journal of environmental research and public health*. 2018;15(8).
112. Alidjinou EK, Deldalle J, Hallaert C, Robineau O, Ajana F, Choisy P, et al. RNA and DNA Sanger sequencing versus next-generation sequencing for HIV-1 drug resistance testing in treatment-naive patients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(10):2823-30.
113. Moscona R, Ram D, Wax M, Bucris E, Levy I, Mendelson E, et al. Comparison between next-generation and Sanger-based sequencing for the detection of transmitted drug-resistance mutations among recently infected HIV-1 patients in Israel, 2000-2014. *Journal of the International AIDS Society*. 2017;20(1):21846.
114. Dessilly G, Goeminne L, Vandenbroucke AT, Dufrasne FE, Martin A, Kabamba-Mukadi B. First evaluation of the Next-Generation Sequencing platform for the detection of HIV-1 drug resistance mutations in Belgium. *PloS one*. 2018;13(12):e0209561.
115. Alidjinou EK, Coulon P, Hallaert C, Robineau O, Meybeck A, Huleux T, et al. Routine drug resistance testing in HIV-1 proviral DNA, using an automated next-generation



- sequencing assay. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2019;121:104207.
116. Novitsky V, Nyandiko W, Vreeman R, DeLong AK, Manne A, Scanlon M, et al. Added Value of Next Generation over Sanger Sequencing in Kenyan Youth with Extensive HIV-1 Drug Resistance. *Microbiology spectrum*. 2022;10(6):e0345422.
117. World Health O. Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022-2030. Geneva: World Health Organization; 2022 2022.
118. Gutiérrez-Sevilla JE, Cárdenas-Bedoya J, Escoto-Delgadillo M, Zúñiga-González GM, Pérez-Ríos AM, Gómez-Meda BC, et al. Genomic instability in people living with HIV. *Mutation research Genetic toxicology and environmental mutagenesis*. 2021;865:503336.
119. Aves T, Tambe J, Siemieniuk RAC, Mbuagbaw L. Antiretroviral resistance testing in HIV-positive people *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018(11):70.
120. Galli L, Parisi MR, Poli A, Menozzi M, Fiscon M, Garlassi E, et al. Burden of Disease in PWH Harboring a Multidrug-Resistant Virus: Data From the PRESTIGIO Registry. *Open forum infectious diseases*. 2020;7(11):ofaa456.
121. Raymond S, Nicot F, Abravanel F, Minier L, Carcenac R, Lefebvre C, et al. Performance evaluation of the Vela Dx Sentosa next-generation sequencing system for HIV-1 DNA genotypic resistance. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2020;122:104229.
122. Ji H, Sandstrom P, Paredes R, Harrigan PR, Brumme CJ, Avila Rios S, et al. Are We Ready for NGS HIV Drug Resistance Testing? The Second "Winnipeg Consensus" Symposium. *Viruses*. 2020;12(6).
123. Ávila-Ríos S, Parkin N, Swanstrom R, Paredes R, Shafer R, Ji H, et al. Next-Generation Sequencing for HIV Drug Resistance Testing: Laboratory, Clinical, and Implementation Considerations. *Viruses*. 2020;12(6).
124. May S, Adamska E, Tang J. Evaluation of Vela Diagnostics HIV-1 genotyping assay on an automated next generation sequencing platform. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2020;127:104376.



125. Gholami M, Rouzbahani N, Samiee S, Tayeri K, Ghorban K, Dehkharghani AD, et al. HIV-1 drug resistance mutations detection and HIV-1 subtype G report by using next-generation sequencing platform. *Microbial pathogenesis*. 2020;146:104221.
126. Cozzi-Lepri A, Noguera-Julian M, Di Giallonardo F, Schuurman R, Däumer M, Aitken S, et al. Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case–control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(3):930-40.
127. Geretti AM, Conibear T, Hill A, Johnson JA, Tambuyzer L, Thys K, et al. Sensitive testing of plasma HIV-1 RNA and Sanger sequencing of cellular HIV-1 DNA for the detection of drug resistance prior to starting first-line antiretroviral therapy with etravirine or efavirenz. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(4):1090-7.
128. Xiaobai Z, Xi C, Tian H, Williams AB, Wang H, He J, et al. Prevalence of WHO transmitted drug resistance mutations by deep sequencing in antiretroviral-naïve subjects in Hunan Province, China. *PloS one*. 2014;9(6):e98740.
129. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PloS one*. 2009;4(3):e4724.
130. Metzner KJ, Scherrer AU, Preiswerk B, Joos B, von Wyl V, Leemann C, et al. Origin of minority drug-resistant HIV-1 variants in primary HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases*. 2013;208(7):1102-12.
131. Alexander HK, Bonhoeffer S. Pre-existence and emergence of drug resistance in a generalized model of intra-host viral dynamics. *Epidemics*. 2012;4(4):187-202.
132. Dolling D, Sabin C, Delpech V, Smit E, Pozniak A, Asboe D, et al. Time trends in drug resistant HIV-1 infections in the United Kingdom up to 2009: multicentre observational study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2012;345:e5253.
133. Schmidt D, Kollan C, Fätkenheuer G, Schülter E, Stellbrink HJ, Noah C, et al. Estimating trends in the proportion of transmitted and acquired HIV drug resistance in a long term observational cohort in Germany. *PloS one*. 2014;9(8):e104474.
134. Li JZ, Paredes R, Ribaldo HJ, Svarovskaia ES, Metzner KJ, Kozal MJ, et al. Low-Frequency HIV-1 Drug Resistance Mutations and Risk of NNRTI-Based Antiretroviral



- Treatment Failure: A Systematic Review and Pooled Analysis. *JAMA*. 2011;305(13):1327-35.
135. Hassan AS, Bibby DF, Mwaringa SM, Agutu CA, Ndirangu KK, Sanders EJ, et al. Presence, persistence and effects of pre-treatment HIV-1 drug resistance variants detected using next generation sequencing: A Retrospective longitudinal study from rural coastal Kenya. *PloS one*. 2019;14(2):e0210559.
136. Hofstra LM, Sauvageot N, Albert J, Alexiev I, Garcia F, Struck D, et al. Transmission of HIV Drug Resistance and the Predicted Effect on Current First-line Regimens in Europe. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2016;62(5):655-63.
137. Wensing AM, Calvez V, Günthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, et al. 2015 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Topics in antiviral medicine*. 2015;23(4):132-41.
138. Rhee SY, Jordan MR, Raizes E, Chua A, Parkin N, Kantor R, et al. HIV-1 Drug Resistance Mutations: Potential Applications for Point-of-Care Genotypic Resistance Testing. *PloS one*. 2015;10(12):e0145772.
139. Young B, Fransen S, Greenberg KS, Thomas A, Martens S, St Clair M, et al. Transmission of integrase strand-transfer inhibitor multidrug-resistant HIV-1: case report and response to raltegravir-containing antiretroviral therapy. *Antiviral therapy*. 2011;16(2):253-6.
140. Casadellà M, van Ham PM, Noguera-Julian M, van Kessel A, Pou C, Hofstra LM, et al. Primary resistance to integrase strand-transfer inhibitors in Europe. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(10):2885-8.
141. Boyd SD, Maldarelli F, Sereti I, Ouedraogo GL, Rehm CA, Boltz V, et al. Transmitted raltegravir resistance in an HIV-1 CRF_AG-infected patient. *Antiviral therapy*. 2011;16(2):257-61.
142. Wainberg MA, Han YS, Mesplède T. Might dolutegravir be part of a functional cure for HIV? *Canadian journal of microbiology*. 2016;62(5):375-82.
143. U.S. Department of Health and Human Services Oral Health Strategic Framework, 2014-2017. *Public health reports (Washington, DC : 1974)*. 2016;131(2):242-57.



144. Günthard HF, Aberg JA, Eron JJ, Hoy JF, Telenti A, Benson CA, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA*. 2014;312(4):410-25.
145. Codoñer FM, Pou C, Thielen A, García F, Delgado R, Dalmau D, et al. Added value of deep sequencing relative to population sequencing in heavily pre-treated HIV-1-infected subjects. *PloS one*. 2011;6(5):e19461.
146. Shafer Robert W, Hertogs K, Zolopa Andrew R, Warford A, Bloor S, Betts Bradley J, et al. High Degree of Interlaboratory Reproducibility of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease and Reverse Transcriptase Sequencing of Plasma Samples from Heavily Treated Patients. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(4):1522-9.
147. Vizcaíno-Salazar G. Importancia de la sencibilidad, la especialidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina y Laboratorio*. 2017;23(7-8):365-86.
148. Woods Conan K, Brumme Chanson J, Liu Tommy F, Chui Celia KS, Chu Anna L, Wynhoven B, et al. Automating HIV Drug Resistance Genotyping with RECall, a Freely Accessible Sequence Analysis Tool. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(6):1936-42.
149. Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, Halvas Elias K, Bixby Christian J, Bazmi H, et al. Multiple, Linked Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Mutations in Treatment-Experienced Patients Are Missed by Standard Genotype Analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(1):406-13.
150. Schuurman R, Brambilla D, de Groot T, Huang D, Land S, Bremer J, et al. Underestimation of HIV Type 1 Drug Resistance Mutations: Results from the ENVA-2 Genotyping Proficiency Program. *AIDS research and human retroviruses*. 2002;18(4):243-8.
151. Church JD, Jones D, Flys T, Hoover D, Marlowe N, Chen S, et al. Sensitivity of the ViroSeq HIV-1 Genotyping System for Detection of the K103N Resistance Mutation in HIV-1 Subtypes A, C, and D. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2006;8(4):430-2.
152. Mohamed S, Penaranda G, Gonzalez D, Camus C, Khiri H, Boulmé R, et al. Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure. *AIDS (London, England)*. 2014;28(9).



153. Pou C, Noguera-Julian M, Pérez-Álvarez S, García F, Delgado R, Dalmau D, et al. Improved Prediction of Salvage Antiretroviral Therapy Outcomes Using Ultrasensitive HIV-1 Drug Resistance Testing. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;59(4):578-88.
154. Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH, Novak RM, MacArthur RD, Baxter JD, et al. Low-Abundance Drug-Resistant Viral Variants in Chronically HIV-Infected, Antiretroviral Treatment–Naive Patients Significantly Impact Treatment Outcomes. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199(5):693-701.
155. Varghese V, Shahriar R, Rhee S-Y, Liu T, Simen BB, Egholm M, et al. Minority Variants Associated with Transmitted and Acquired HIV-1 Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance: Implications for the Use of Second-Generation Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2009;52(3).
156. Le T, Chiarella J, Simen BB, Hanczaruk B, Egholm M, Landry ML, et al. Low-Abundance HIV Drug-Resistant Viral Variants in Treatment-Experienced Persons Correlate with Historical Antiretroviral Use. *PloS one*. 2009;4(6):e6079.
157. Huber M, Metzner KJ, Geissberger FD, Shah C, Leemann C, Klimkait T, et al. MinVar: A rapid and versatile tool for HIV-1 drug resistance genotyping by deep sequencing. *Journal of Virological Methods*. 2017;240:7-13.
158. Trabaud M-A, Icard V, Ramière C, Tardy J-C, Scholtes C, André P. Comparison of HIV-1 drug-resistance genotyping by ultra-deep sequencing and sanger sequencing using clinical samples. *Journal of medical virology*. 2017;89(11):1912-9.
159. Mbunkah HA, Bertagnolio S, Hamers RL, Hunt G, Inzaule S, Rinke De Wit TF, et al. Low-Abundance Drug-Resistant HIV-1 Variants in Antiretroviral Drug-Naive Individuals: A Systematic Review of Detection Methods, Prevalence, and Clinical Impact. *The Journal of infectious diseases*. 2020;221(10):1584-97.
160. Moore Hannah P, Palumbo Philip J, Notarte Kin I, Fogel Jessica M, Cummings V, Gamble T, et al. Performance of the Applied Biosystems HIV-1 Genotyping Kit with Integrase. *Journal of clinical microbiology*. 2024;62(6):e00136-24.
161. Learn GH, Jr., Korber BT, Foley B, Hahn BH, Wolinsky SM, Mullins JI. Maintaining the integrity of human immunodeficiency virus sequence databases. *Journal of virology*. 1996;70(8):5720-30.



162. Jabara CB, Jones CD, Roach J, Anderson JA, Swanstrom R. Accurate sampling and deep sequencing of the HIV-1 protease gene using a Primer ID. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(50):20166-71.
163. Varghese V, Wang E, Babrzadeh F, Bachmann MH, Shahriar R, Liu T, et al. Nucleic Acid Template and the Risk of a PCR-Induced HIV-1 Drug Resistance Mutation. *PLoS one*. 2010;5(6):e10992.
164. Welkers MRA, Jonges M, Jeeninga RE, Koopmans MPG, de Jong MD. Improved detection of artifactual viral minority variants in high-throughput sequencing data. *Frontiers in microbiology*. 2015;5.
165. Gianella S, Delport W, Pacold Mary E, Young Jason A, Choi Jun Y, Little Susan J, et al. Detection of Minority Resistance during Early HIV-1 Infection: Natural Variation and Spurious Detection rather than Transmission and Evolution of Multiple Viral Variants. *Journal of virology*. 2011;85(16):8359-67.
166. Keys JR, Zhou S, Anderson JA, Eron JJ, Rackoff LA, Jabara C, et al. Primer ID Informs Next-Generation Sequencing Platforms and Reveals Preexisting Drug Resistance Mutations in the HIV-1 Reverse Transcriptase Coding Domain. *AIDS research and human retroviruses*. 2015;31(6):658-68.
167. Zhou S, Jones C, Mieczkowski P, Swanstrom R. Primer ID Validates Template Sampling Depth and Greatly Reduces the Error Rate of Next-Generation Sequencing of HIV-1 Genomic RNA Populations. *Journal of virology*. 2015;89(16):8540-55.
168. Clutter DS, Zhou S, Varghese V, Rhee S-Y, Pinsky BA, Jeffrey Fessel W, et al. Prevalence of Drug-Resistant Minority Variants in Untreated HIV-1–Infected Individuals With and Those Without Transmitted Drug Resistance Detected by Sanger Sequencing. *The Journal of Infectious Diseases*. 2017;216(3):387-91.
169. Dauwe K, Staelens D, Vancoillie L, Mortier V, Verhofstede C. Deep Sequencing of HIV-1 RNA and DNA in Newly Diagnosed Patients with Baseline Drug Resistance Showed No Indications for Hidden Resistance and Is Biased by Strong Interference of Hypermutation. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54(6):1605-15.
170. Noguera-Julian M, Cozzi-Lepri A, Di Giallonardo F, Schuurman R, Däumer M, Aitken S, et al. Contribution of APOBEC3G/F activity to the development of low-abundance



- drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016;22(2):191-200.
171. Delviks-Frankenberry KA, Nikolaitchik OA, Burdick RC, Gorelick RJ, Keele BF, Hu W-S, et al. Minimal Contribution of APOBEC3-Induced G-to-A Hypermutation to HIV-1 Recombination and Genetic Variation. *PLoS pathogens*. 2016;12(5):e1005646.
172. Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica: Presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Medica*. 2020;61(2).
173. Jain V, Sucupira MC, Bacchetti P, Hartogensis W, Diaz RS, Kallas EG, et al. Differential Persistence of Transmitted HIV-1 Drug Resistance Mutation Classes. *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(8):1174-81.
174. Pinggen M, Wensing AMJ, Fransen K, De Bel A, de Jong D, Hoepelman AIM, et al. Persistence of frequently transmitted drug-resistant HIV-1 variants can be explained by high viral replication capacity. *Retrovirology*. 2014;11(1):105.
175. Li JZ. HIV-1 Drug-Resistant Minority Variants: Sweating the Small Stuff. *The Journal of infectious diseases*. 2013;209(5):639-41.
176. Hernández Requejo D, Franco Lacato AO, Iglesias Pérez E, Calderón Sandubete E, de Armas Rodríguez Y. Polimorfismo genético del correceptor CCR5 en pacientes cubanos VIH/sida de la tercera edad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2021;40.
177. Ávila-Ríos S, García-Morales C, Matías-Florentino M, Romero-Mora KA, Tapia-Trejo D, Quiroz-Morales VS, et al. Pretreatment HIV-drug resistance in Mexico and its impact on the effectiveness of first-line antiretroviral therapy: a nationally representative 2015 WHO survey. *The Lancet HIV*. 2016;3(12):e579-e91.
178. Perrier M, Visseaux B, Landman R, Joly V, Todesco E, Yazdanpanah Y, et al. No impact of HIV-1 protease minority resistant variants on the virological response to a first-line PI-based regimen containing darunavir or atazanavir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;73(1):173-6.
179. Charpentier C, Lee GQ, Rodriguez C, Visseaux B, Storto A, Fagard C, et al. Highly frequent HIV-1 minority resistant variants at baseline of the ANRS 139 TRIO trial had a



- limited impact on virological response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(7):2090-6.
180. Kyeyune F, Gibson Richard M, Nankya I, Venner C, Metha S, Akao J, et al. Low-Frequency Drug Resistance in HIV-Infected Ugandans on Antiretroviral Treatment Is Associated with Regimen Failure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(6):3380-97.
181. Boltz VF, Bao Y, Lockman S, Halvas EK, Kearney MF, McIntyre JA, et al. Low-Frequency Nevirapine (NVP)–Resistant HIV-1 Variants Are Not Associated With Failure of Antiretroviral Therapy in Women Without Prior Exposure to Single-Dose NVP. *The Journal of infectious diseases*. 2014;209(5):703-10.
182. Clutter DS, Rojas Sánchez P, Rhee SY, Shafer RW. Genetic Variability of HIV-1 for Drug Resistance Assay Development. *Viruses*. 2016;8(2).
183. Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwang D. HIV subtype diversity worldwide. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2019;14(3):153–60.
184. Sivay MV, Hudelson SE, Wang J, Agyei Y, Hamilton EL, Selin A, et al. HIV-1 diversity among young women in rural South Africa: HPTN 068. *PloS one*. 2018;13(7):e0198999.
185. Oster AM, Switzer WM, Hernandez AL, Saduvala N, Wertheim JO, Nwangwu-Ike N, et al. Increasing HIV-1 subtype diversity in seven states, United States, 2006-2013. *Annals of epidemiology*. 2017;27(4):244-51.e1.
186. Kline RL, Saduvala N, Zhang T, Oster AM. Diversity and characterization of HIV-1 subtypes in the United States, 2008-2016. *Annals of epidemiology*. 2019;33:84-8.
187. Mendoza Y, Bello G, Castillo Mewa J, Martínez AA, González C, García-Morales C, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Panama: origin of non-B subtypes in samples collected from 2007 to 2013. *PloS one*. 2014;9(1):e85153.
188. Delatorre E, Couto-Fernandez JC, Bello G. HIV-1 Genetic Diversity in Northeastern Brazil: High Prevalence of Non-B Subtypes. *AIDS research and human retroviruses*. 2017;33(7):639-47.
189. Vázquez-Valls E, Escoto-Delgadillo M, López-Márquez FC, Castellero-Manzano M, Echegaray-Guerrero E, Bitzer-Quintero OK, et al. Molecular epidemiology of HIV type 1



- in Mexico: emergence of BG and BF intersubtype recombinants. *AIDS research and human retroviruses*. 2010;26(7):777-81.
190. Guimarães ML, Velarde-Dunois KG, Segurondo D, Morgado MG. The HIV-1 epidemic in Bolivia is dominated by subtype B and CRF12_BF "family" strains. *Virology journal*. 2012;9:19.
191. Beloukas A, Psarris A, Giannelou P, Kostaki E, Hatzakis A, Paraskevis D. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2016;46:180-9.
192. Ueda S, Witaningrum AM, Khairunisa SQ, Kotaki T, Nasronudin, Kameoka M. Genetic Diversity and Drug Resistance of HIV-1 Circulating in North Sulawesi, Indonesia. *AIDS research and human retroviruses*. 2019;35(4):407-13.
193. Li D, Chen Q, Tao C. BCP/PC mutation prevalence and their association with HBV replication in HIV/HBV co-infected patients. *Archives of virology*. 2018;163(10):2829-33.
194. Nii-Trebi NI, Brandful JAM, Ibe S, Sugiura W, Barnor JS, Bampoh PO, et al. Dynamic HIV-1 genetic recombination and genotypic drug resistance among treatment-experienced adults in northern Ghana. *Journal of medical microbiology*. 2017;66(11):1663-72.
195. Nanfack AJ, Redd AD, Bimela JS, Ncham G, Achem E, Banin AN, et al. Multimethod Longitudinal HIV Drug Resistance Analysis in Antiretroviral-Therapy-Naive Patients. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(9):2785-800.
196. Yang Z, Wei S, Liu J, Piao J, Xu L, Sun Y, et al. Characterization of HIV-1 subtypes and drug resistance mutations in Henan Province, China (2017-2019). *Archives of virology*. 2020;165(6):1453-61.
197. Chen J, Peng C, Wang J, Zhu W. Exploring molecular mechanism of allosteric inhibitor to relieve drug resistance of multiple mutations in HIV-1 protease by enhanced conformational sampling. *Proteins*. 2018;86(12):1294-305.
198. Vahabpour R, Bokharaei-Salim F, Kalantari S, Garshasbi S, Monavari SH, Esghaei M, et al. HIV-1 genetic diversity and transmitted drug resistance frequency among Iranian treatment-naive, sexually infected individuals. *Archives of virology*. 2017;162(6):1477-85.



199. Li K, Ou W, Feng Y, Sun J, Ge Z, Xing H, et al. Near Full-Length Genomic Characterization of a Novel HIV Type 1 Recombinant Form (CRF01_AE/B) Identified from Anhui, China. *AIDS research and human retroviruses*. 2018;34(12):1100-5.
200. Yin Y, Liu Y, Zhu J, Hong X, Yuan R, Fu G, et al. The prevalence, temporal trends, and geographical distribution of HIV-1 subtypes among men who have sex with men in China: A systematic review and meta-analysis. *Epidemiology and infection*. 2019;147:e83.
201. Cevallos CG, Jones LR, Pando MA, Carr JK, Avila MM, Quarleri J. Genomic characterization and molecular evolution analysis of subtype B and BF recombinant HIV-1 strains among Argentinean men who have sex with men reveal a complex scenario. *PloS one*. 2017;12(12):e0189705.
202. Kostaki EG, Flampouris A, Karamitros T, Chueca N, Alvarez M, Casas P, et al. Spatiotemporal Characteristics of the Largest HIV-1 CRF02_AG Outbreak in Spain: Evidence for Onward Transmissions. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:370.
203. Abongwa LE, Nyamache AK, Torimiro JN, Okemo P, Charles F. Human immunodeficiency virus type 1 ((HIV-1) subtypes in the northwest region, Cameroon. *Virology journal*. 2019;16(1):103.
204. Pérez L, Kourí V, Alemán Y, Abrahantes Y, Correa C, Aragonés C, et al. Antiretroviral drug resistance in HIV-1 therapy-naive patients in Cuba. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013;16:144-50.
205. Aulicino PC, Gómez Carrillo M, Kopka J, Mangano AM, Ovejero M, Sen L. HIV-1 genetic diversity in Argentina and early diagnosis of perinatal infection. *Medicina*. 2006;66(4):319-26.
206. Aulicino PC, Rocco CA, Mecikovsky D, Bologna R, Mangano A, Sen L. HIV type-1 genotypic resistance profiles in vertically infected patients from Argentina reveal an association between K103N+L100I and L74V mutations. *Antiviral therapy*. 2010;15(4):641-50.
207. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science (New York, NY)*. 2006;313(5786):523-6.



208. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science (New York, NY)*. 2000;287(5453):607-14.
209. Nchinda N, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Kirtley S, Hemelaar J. Global associations of key populations with HIV-1 recombinants: a systematic review, global survey, and individual participant data meta-analysis. *Frontiers in public health*. 2023;11:1153638.
210. Machado LY, Y. P, M. DH, Pérez L, Blanco M, Kourí V, et al. Increase of recombinant forms CRF 20,23,24_BG and several URF of HIV-1 among newly diagnosed Cuban patients: 2013-2014. *ARC J of AIDS*. 2017;2(1):24-31.