INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ.
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA.
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA .

# Resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales y su relación con la variabilidad genética en muestras de pacientes cubanos. 2009-2014.

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud.

Autor: Lic. Yoan Alemán Campos. MsC.

La Habana
2021

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ.
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA.
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA.

# Resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales y su relación con la variabilidad genética en muestras de pacientes cubanos. 2009-2014.

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud.

Autor: Lic. Yoan Alemán Campos. MsC.

Tutoras: Dra. Vivian Kourí Cardellá. Dr.Cs.
Lic. Lissette Pérez Santos. Dra. C.

La Habana
2021

# AGRADECIMIENTOS

A LOS PACIENTES.

A MI FAMILIA.

A MIS AMIGOS.

A MIS PROFESORES.

DEDICATORIA.

A MI HIJO.

# LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|---|---|
| 3TC | lamivudina |
| µL | microlitros |
| A | alanina |
| ABC | abacavir |
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| ARN | ácido ribonucleico |
| ARNasa H | ribonucleasa H |
| ARNm | ácido ribonucleico mensajero |
| ARNt | ácido ribonucleico de transferencia |
| ARV(s) | antirretroviral(es) |
| ATV | atazanavir |
| AZT | zidovudina |
| C | cisteína |
| CCR5 | receptor de quimoquinas CC tipo 5 |
| CITMA | Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente |
| CMSP | células mononucleares de sangre periférica |
| CPI | complejo de pre integración |
| CPR | siglas del inglés Calibrated Population Resistance Tool |
| cpx | abreviatura de complejo, del inglés complex |
| CRF | forma recombinante circulante (por sus siglas en inglés) |
| CV | carga viral |
| CXCR4 | receptor de quimoquinas CXC tipo 4 |
| D | aspartato o ácido aspártico |
| d4T | estavudina |
| DDC | zalcitabina |
| ddI | didanosina |
| DE | desviación estándar |
| ddNTP | dideoxinucleótido trifosfato |
| dNTP | deoxinucleótido trifosfato |
| DLV | delavirdina |
| E | glutamato o ácido glutámico |
| EDTA | ácido etilendiamino tetracético |
| EFV | efavirenz |
| *env* | gen de envoltura |
| ETV | etravirina |
| EVG | elvitegravir |
| F | fenilalanina |
| FTC | emtricitabina |
| G | Guanina |
| gag | gen de antígeno de grupo |
| gp | glicoproteína |
| H | histidina |
| HSH | hombres que tienen sexo con hombres |
| HT | heterosexual |
| I | isoleucina |
| IDV | indinavir |

| | |
|---|---|
| IF | inhibidores de fusión |
| IIN | inhibidores de la integrasa |
| IP | inhibidores de la proteasa |
| IPK | Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” |
| IS | inductores de sincicios |
| ITI | inhibidores de la transcriptasa inversa |
| ITIAN | inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos |
| ITINAN | inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos |
| ITS | infecciones de transmisión sexual |
| K | lisina |
| Kb | kilobase |
| L | leucina |
| LPV | lopinavir |
| M | metionina |
| MRA | mutaciones de resistencia a los ARVs |
| min | minutos |
| MINSAP | Ministerio de Salud Pública |
| mL | mililitros |
| MVRA | mutaciones de vigilancia de la resistencia a los ARVs. |
| N | asparagina |
| NFV | nelfinavir |
| NIS | no inductores de sincicios |
| NVB | niveles de viremia bajos |
| NVP | nevirapina |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ONUSIDA | Organización de Naciones Unidas Para la Atención del Sida |
| P | prolina |
| pb | pares de bases |
| *pol* | gen de la polimerasa |
| Q | glutamina |
| R | arginina |
| RCC | resistencia completa a una clase de ARVs |
| RCP | reacción en cadena de la polimerasa |
| RCP-TR | reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real |
| RMA | resistencia a múltiples ARVs |
| RTV | ritonavir |
| S | serina |
| SIDA | síndrome de inmunodeficiencia adquirida |
| SQV | saquinavir |
| T | treonina |
| TAMs | mutaciones asociadas a timidina (del inglés thymidine associated mutations) |
| TARVAE | terapia antirretroviral altamente eficaz. |
| TBE | tampón de corrida tris borato etilendiamino-tetracetato. |
| TDF | tenofovir |
| TI | transcriptasa inversa |
| TI-RCP | transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa |

| | |
|---|---|
| URF | forma recombinante única (por sus siglas en inglés) |
| VIH-1 | virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 |
| VIH-2 | virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 |
| VIS cpz | virus de inmunodeficiencia de los simios (chimpancé) |
| VISsm | virus de inmunodeficiencia de los simios (mangabeys tiznados) |

# SÍNTESIS

En el presente estudio se implementó un ensayo genotípico para determinar la resistencia del VIH-1 a la TARVAE y su relación con la variabilidad genética. Este ensayo mostró índices de fidelidad, repetitividad y reproducibilidad de 98,7%, 98,8%, y 99,9%, respectivamente. La frecuencia de las mutaciones de resistencia en individuos sin terapia previa fue del 11,4% y del 80,0% en pacientes tratados. La mutación I47V fue significativamente más frecuente en individuos infectados con las CRF (20, 23,24) _BG (p=0,029), mientras que la L210W apareció con mayor frecuencia en individuos infectados con la CRF19_cpx (p=0,007). Se observó una tendencia a la disminución de la resistencia completa a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y a los inhibidores de la proteasa, así como de la resistencia múltiple a los ARVs (p<0,003). Esta investigación describió la resistencia a los ARVs que se utilizan en las estrategias terapéuticas establecidas en Cuba. Además, informó el incremento de algunas formas recombinantes de origen cubano y su asociación con mutaciones de resistencia. La infección con algunas variantes genéticas recombinantes de origen cubano y la exposición a múltiples regímenes de TARVAE, se relacionaron con la frecuencia alta de mutaciones de resistencia del VIH-1 en Cuba.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN. 1
I.1. Hipótesis de trabajo. 4
I.2. Objetivos. 4
I.2.1. Objetivo general. 4
I.2.2. Objetivos específicos. 4
I.3. Novedad científica. 4
I.4. Importancia teórica. 4
I.5. Importancia práctica. 5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. 6
II.1. Historia del VIH. 6
II.2. Origen del VIH. 7
II.3. Clasificación taxonómica. 7
II.4. Estructura del virión. 8
II.5. Organización del genoma. 8
II.6. Variabilidad genética y clasificación genotípica del VIH-1. 10
II.7. Distribución mundial y regional de los subtipos del VIH-1 12
II.8. Replicación del virus. 13
II.9. Receptores, correceptores de entrada del VIH-1 y clasificación fenotípica del VIH-1. 14
II.10. Historia natural de la enfermedad 15
II.11. Epidemiología. 17
II.12. Epidemiología en Cuba 17
II.13. Terapia antirretroviral. 18
II.14. Nuevos medicamentos antirretrovirales. 20
II.15. Fallo a la terapia ARV: 21
II.16. Resistencia viral a la terapia. 21
II.16.1. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos. 22
II.16.2. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos. 23

II.16.3. Resistencia a los inhibidores de la proteasa 23
II.16.4. Resistencia a los antagonistas de los correceptores (CCR5). 24
II.16.5. Resistencia a los inhibidores de la integrasa. 24
II.17. Ensayos genotípicos para la determinación de la resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales 25
II.17.1. Plan de acción mundial 2017-2021 sobre la farmacorresistencia del VIH. 26
III. DISEÑO METODOLÓGICO: 29
III.1. Población de estudio, criterios de inclusión y de exclusión. 29
III.2. Validación de un ensayo in-house para la determinación del genotipo de VIH-1 y la evaluación de la resistencia a los antirretrovirales en Cuba. 29
III.2.1. Muestras Clínicas. 29
III.2.2. Ensayo in-house para la determinación del genotipo. 30
III.2.2.1 Diseño de los cebadores. 30
III.2.2.2 Extracción del ARN. 31
III.2.2.3 Amplificación. 31
III.2.2.4 Secuenciación nucleotídica. 33
III.1.2.4.1 Determinación del subtipo. 33
III.1.2.4.2 Determinación de la resistencia a los medicamentos antirretrovirales. 34
III.1.2.4.3 Control de Calidad. 34
III.2.3. Evaluación de la resolución del ensayo in-house. 35
III.2.3.1 Determinación del límite inferior de amplificación. 35
III.2.3.2 Evaluación de la fidelidad del ensayo. 35
III.2.3.3 Evaluación de la precisión del ensayo in-house. 37
III.2.3.4 Evaluación de la aplicación del ensayo in-house en muestras clínicas 38
III.3. Evaluación de la resistencia del VIH-1 a los ARVs en Cuba después de la implementación de los ensayos genotípicos de resistencia a los antirretrovirales. 38
III.3.1. Diseño epidemiológico del estudio y muestras clínicas. 38
III.3.2. Ensayo genotípico in-house de resistencia. 39
III.3.3. Análisis de los resultados. 39
III.3.3.1 Subtipo 39

III.3.3.2 Resistencia en no tratados 39
III.3.3.3 Resistencia en Tratados 39
III.4. Consideraciones Éticas. 39
III.5. Análisis estadístico de los resultados 40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 41
IV.1. Estandarización de un ensayo in-house para la determinación del genotipo de VIH-1 y la evaluación de la resistencia a los antirretrovirales en Cuba. 41
IV.1.1. Determinación del límite inferior de amplificación. 41
IV.1.2. Fidelidad. 42
IV.1.3. Precisión. 49
IV.1.4. Evaluación de la aplicación del ensayo in-house en muestras clínicas. 54
IV.1.5. Control de calidad. 57
IV.2. Resistencia del VIH-1 a los ARVs en Cuba después de la implementación de los ensayos genotípicos de resistencia a los antirretrovirales. 59
IV.2.1. Características generales de la población de estudio. 59
IV.2.2. Diversidad del VIH. 64
IV.2.3. Mutaciones de resistencia a los ARVs en los pacientes sin tratamiento previo. 67
IV.2.4. Mutaciones de resistencia a los ARVs en pacientes con tratamiento. 71
IV.2.5. Resistencia adquirida en los pacientes expuestos a la terapia. 76
IV.2.6. Distribución de las mutaciones de resistencia entre los diferentes subtipos. 80
V. DISCUSIÓN GENERAL. 85
CONCLUSIONES. 89
RECOMENDACIONES 90
REFERENCIAS. 91
ANEXOS 109
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS. 115
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL AUTOR NO RELACIONADAS CON EL TEMA DE LA TESIS 122

# I. INTRODUCCIÓN

# I. INTRODUCCIÓN.

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Los primeros casos de esta enfermedad se describieron en el año 1981 y en 1983 se demostró que el VIH era su agente causal (1). Aunque se realizan grandes esfuerzos para eliminar esta enfermedad, 1,7 millones de personas contrajeron la infección por el VIH en el año 2019 y 690.000 personas fallecieron a causa de enfermedades relacionadas con el sida. Hasta finales del año 2019, 38,0 millones de personas vivían con VIH en el mundo y desde el comienzo de la epidemia, 75,7 millones de personas contrajeron la infección por el VIH (2).

Hasta el año 1987 no existía un medicamento paliativo para los millones de personas que enfermaban y morían debido a las enfermedades oportunistas que desarrollaban los pacientes con VIH/SIDA en el mundo. En ese año, se introdujo en el tratamiento de los pacientes, el primero de los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN), que se llamó zidovudina (AZT). La terapia con AZT produjo un incremento sustancial en la sobrevida y en la calidad de vida de los pacientes infectados con el VIH (3). Entre los años 1990 y 1994 se introdujeron como opciones de tratamiento otros tres medicamentos de esta misma familia (4). En el año 1995 ya era evidente que la terapia combinada con dos ITIAN era más efectiva que la monoterapia, lo cual dio lugar a la era de las combinaciones (5). Entre los años 1995 y 1996 se aprobaron los primeros inhibidores de la proteasa (IP); en el propio año 1996 se obtuvo la licencia para la nevirapina (NVP), el primer inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos (ITINAN). En ese momento ya había tres clases de medicamentos disponibles, que comenzaron a utilizarse de manera combinada. A partir de entonces comenzó a extenderse la expresión “terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE)” que consiste en utilizar como tratamiento la combinación de al menos tres medicamentos, sean o  no de la misma familia (6).

No obstante, desde el año 1990 se describió la aparición de la resistencia a los medicamentos que se incluyen en la terapia antirretroviral (7). El desarrollo de variantes de virus resistentes es una de las principales razones del fracaso de la terapia antirretroviral. Esto se debe, fundamentalmente, a la alta tasa de mutación que presenta el virus, por carecer, su enzima transcriptasa inversa (TI), de actividad exonucleasa correctora (8). Varios factores facilitan la aparición de la resistencia, entre los que se destacan: la falta de

potencia de las combinaciones de medicamentos ARVs que se utilizan en la TARVAE; las opciones limitadas de sustitución de los mismos cuando es necesario y la mala adherencia al tratamiento. En los países de bajos ingresos económicos, son limitadas las opciones de terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE) y la disponibilidad de pruebas de laboratorio para determinar resistencia. Esto facilita la emergencia de la resistencia del VIH-1 a la TARVAE y disminuye los beneficios sostenidos de la misma, aún más cuando esta resistencia puede transmitirse de un individuo a otro (9).

A finales del año 2020, se informó en Cuba que más de 25 756 personas vivían con el VIH, de ellas más del 84% recibían tratamiento (Registro Nacional de VIH 2020, Ministerio de Salud, Cuba). En Cuba, el acceso a la TARVAE aumentó de forma rápida, a partir de su introducción en el año 2001, lo que contribuyó a la reducción marcada de la morbi-mortalidad por el VIH (10). Aunque la prevalencia del VIH-1 en Cuba es la más baja de América Latina y el Caribe (0,4%) (Registro Nacional de VIH 2020, Ministerio de Salud, Cuba), la epidemia se caracteriza por una diversidad genética inusualmente alta, en contraste con el resto de la región del Caribe (11, 12). Las variantes genéticas reportadas en Cuba incluyen los subtipos B, C, G, H, y las formas recombinantes circulantes (FRCs) cubanas: FRC (20, 23, 24) _BG, FRC18_cpx y FRC19_cpx (13, 14). El subtipo B representa sólo un tercio de la epidemia cubana, mientras que las FRC (20, 23, 24)_BG y varias formas recombinantes únicas (FRU) incrementan su incidencia anualmente (15). La FRC19_cpx se asocia con la progresión rápida al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (16).

Los estudios de variabilidad genética del VIH-1 son más importantes cada día, pues contribuyen al diseño de nuevas estrategias terapéuticas y a la formulación de posibles candidatos de vacunas. El conocimiento de la distribución de las variantes genéticas tiene gran valor ya que puede incidir en la exactitud de las pruebas de diagnóstico, las pruebas de determinación de la carga viral y en los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 a la TARVAE. Además, la susceptibilidad de los diferentes subtipos del VIH-1 a los ARVs es actualmente objeto de mucha atención. Los datos de secuenciación de subtipos no-B son escasos en todo el mundo y se recomienda una mayor investigación de este tema (17).

El Sistema Nacional de Salud Pública de Cuba, a través de su Programa de Prevención y Control del VIH/SIDA, diseñó desde los inicios de la epidemia de VIH, las estrategias encaminadas a la prevención, tratamiento y vigilancia epidemiológica de la misma.

Previo a la presente investigación, dos grupos de científicos cubanos, en colaboración con instituciones extranjeras, estudiaron la prevalencia de la resistencia del VIH a los ARVs. Sus resultados demostraron que existía resistencia a los ITIAN en pacientes tratados y en no tratados, así como resistencia a los ITINAN en tratados. Además, detectaron una proporción elevada de subtipos no-B, gran variabilidad genética, y circulación simultánea de varias formas recombinantes, con predominio de las mismas. Aunque se informó una prevalencia alta de resistencia a los ARVs disponibles en Cuba en ese momento, y una variabilidad genética alta, no se encontró evidencia de que ambos elementos tuvieran relación. Es importante destacar que las investigaciones mencionadas tuvieron que realizarse en instituciones científicas en el extranjero ante la ausencia en Cuba de los medios necesarios para realizar las pruebas genotípicas de resistencia a los ARVS (13-15, 18-21).

En estas condiciones, fue importante ampliar los estudios de resistencia en la población cubana seropositiva al VIH, profundizar en el comportamiento de la variabilidad genética del virus y determinar si existía relación entre ambas. También era necesario evaluar el impacto de la amplia disponibilidad de la terapia ARV en los perfiles de mutaciones de resistencia que se observaron.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, se hizo necesario implementar un ensayo genotípico in-house que permita la determinación de las variantes genéticas y de la resistencia del VIH-1 a la TARVAE en Cuba. Lo cual hace posible el monitoreo de la efectividad de las estrategias terapéuticas establecidas y ampliar los estudios de este tipo en la población seropositiva. También ayuda a profundizar en el comportamiento de la variabilidad genética del VIH-1 y su influencia en el perfil de mutaciones asociadas a la resistencia. Además, permite que Cuba se alinee a las directrices dictadas por la OMS para enfrentar el fenómeno de la resistencia del VIH a los medicamentos ARVs. Esto quedó plasmado en el Plan Estratégico Nacional para la prevención y el control de las ITS, el VIH/sida y las Hepatitis del Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba.

Para dar respuesta a las necesidades mencionadas antes, se desarrolló la presente investigación a partir de la hipótesis siguiente:

### I.1. Hipótesis de trabajo.

La resistencia del VIH-1 a los ARVs empleados en Cuba se relaciona con la variabilidad genética de los virus circulantes y con la terapia empleada.

### I.2. Objetivos.

Para validar o refutar la hipótesis se planteó el objetivo general y los objetivos específicos que se mencionan a continuación:

#### I.2.1. Objetivo general.

Evaluar el comportamiento de la resistencia del VIH-1 a los ARVs entre los años 2009 y 2014 y su relación con la variabilidad genética del virus en muestras de individuos cubanos.

#### I.2.2. Objetivos específicos.

- Evaluar un ensayo genotípico in-house para la determinación de la variante genética y la resistencia del VIH-1 a la TARVAE en muestras de individuos cubanos.
- Determinar la resistencia del VIH-1 a los ARVs en muestras de individuos cubanos seropositivos al VIH-1 entre los años 2009 y 2014.
- Relacionar las variantes genéticas de VIH-1 con las mutaciones de resistencia y con los regímenes de terapia que se prescriben en Cuba.

### I.3. Novedad científica.

- Se implementó por primera vez en Cuba un ensayo genotípico con elevada exactitud, capaz de amplificar y secuenciar los genes de la proteasa y la transcriptasa inversa del VIH-1 en condiciones de gran variabilidad genética.
- Algunas mutaciones de resistencia se observaron con más frecuencia en las variantes genéticas de origen cubano, lo cual influyó en la efectividad de los regímenes de terapias disponibles en el país.
- La resistencia alta a los ARVs en los individuos no tratados justificó la necesidad de realizar un estudio nacional para la vigilancia de la resistencia transmitida.

### I.4. Importancia teórica.

- Describió el comportamiento de la variabilidad genética del VIH-1 entre el año 2009 y el 2014 en Cuba.

- Caracterizó los patrones de la resistencia del VIH-1 a los ARVs diez años después de la introducción de la TARVAE.
- Aporte al conocimiento de la relación entre la variabilidad genética de los subtipos, las formas recombinantes de VIH-1 más frecuentes y los patrones de la resistencia que se observan en la TARVAE en Cuba.

**I.5. Importancia práctica.**

- Implementó las pruebas de resistencia antirretroviral del VIH-1 en Cuba.
- Capacitó al personal de laboratorio y de asistencia médica del IPK en la correcta interpretación de las pruebas de resistencia a los ARVs.
- Introdujo en el Centro de Investigación Diagnóstico y Referencia del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" las herramientas de bioinformática que permitieron analizar la resistencia del VIH a los ARVs utilizando algoritmos que se emplean mundialmente (Servidor de RegaDB instalado en el IPK).
- Aportó resultados que permitieron al MINSAP la vigilancia y el seguimiento de la efectividad de las estrategias terapéuticas establecidas en Cuba.
- Permitió un manejo clínico adecuado de la resistencia del VIH a los ARVs en los pacientes tratados, lo cual incrementó la posibilidad de éxito de la TARVAE.
- Posibilitó la reducción de los niveles de resistencia del VIH a los ARVs en los pacientes tratados mediante el empleo adecuado y oportuno de los resultados de los ensayos genotípicos de resistencia por el personal médico de asistencia.
- Formó parte de los Proyectos Internacionales de Cooperación Interuniversitario (VLIR) con la Universidad de Leuven en Bélgica: "Implementación de las pruebas de resistencia a los ARVs en Cuba" y del Proyecto Internacional con la Región Valona en Bélgica: "Caracterización virológica e Inmunológica de Cepas de VIH de pacientes cubanos con progresión rápida a SIDA" y del Nacional Asociado a Programa: "Estudio de la prevalencia de las mutaciones de resistencia en pacientes cubanos infectados con VIH-1. Análisis filogenético y epidemiológico".

# II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### II.1. Historia del VIH.

El VIH es el agente etiológico del SIDA. En 1980, en los Estados Unidos y Europa, se reportaron casos de individuos previamente saludables que mostraban síntomas de disfunción inmunológica. El nuevo síndrome se caracterizó por linfadenopatías generalizadas, infecciones oportunistas como neumonía por *Pneumocystis jirovecii,* encefalitis por *Toxoplasma gondii*, retinitis por citomegalovirus, meningitis criptococóccica y una variedad de neoplasias malignas como Linfoma no-Hodgkin y Sarcoma de Kaposi (22-25). 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 (26).

En junio del año 1981, la comunidad médica internacional puso su atención por primera vez en la importancia del SIDA como enfermedad emergente. El Centro para el Control de las Enfermedades de Atlanta, EUA, notificó en ese año la existencia de cinco hombres con una inmunodeficiencia severa en el estado de California (27). Esta comunicación antecedió a otras que informaron la presencia de un deterioro del sistema inmunológico en hombres homosexuales y usuarios de drogas intravenosas cuyos linfocitos T respondían deficientemente a los antígenos y a la estimulación con mitógenos. Pocos meses después se dio a conocer que una inmunodeficiencia similar estaba aquejando a otros grupos de individuos. Entre ellos se encontraban los hemofílicos, receptores de transfusiones de sangre, inmigrantes haitianos, y más significativamente, los compañeros sexuales y los hijos de miembros de los diferentes grupos afectados (28). Este patrón epidemiológico emergente sugería que la enfermedad era transmitida por un nuevo patógeno a través de la sangre contaminada o del contacto sexual con individuos infectados. (26).

En el año 1983, científicos del Instituto Pasteur de París aislaron un agente viral de los linfonodos de un individuo asintomático que presentó adenopatías generalizadas de origen desconocido. A este nuevo agente se le denominó LAV (Lymphadenopathy-Associated Virus), (29). Casi simultáneamente, en 1984, Robert Gallo y sus colegas del Instituto Nacional de Salud (NIH, siglas del inglés, National Institute of Health) en EUA informaron el aislamiento de un retrovirus que denominaron Virus de la Leucemia Humana de Células T-III (HTLV-III) (30), y lograron las primeras evidencias serológicas convincentes que

relacionaban al LAV-HTLVIII con la inmunodeficiencia que padecían los individuos infectados (31).

Cuando se demostró que se trataba de un mismo virus, se decidió nombrarlo virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y subsecuentemente VIH-1 (32). En el año 1986 se aisló otro retrovirus con características inmunológicas distintivas y menor patogenicidad que el VIH-1 y que se denominó VIH-2 (33).

### II.2. Origen del VIH.

Con respecto al origen del VIH se propusieron varias teorías y una de las más aceptadas es la "del cazador" que sugiere que la pandemia es una zoonosis viral (34). Se sugiere que el VIH se originó cuando el SIVcpz (SIVcpz, siglas del inglés, simian immunodeficiency virus in captive chimpanzees) pasó del chimpancé al hombre, cuando los chimpancés infectados fueron cazados y consumidos por el hombre. El SIVcpz, presente en la sangre del mono, penetró a través de las laceraciones o heridas del cazador y se adaptó al ser humano, transformándose en VIH-1 (35, 36). La teoría del reloj molecular estima que el origen del VIH-1 se sitúa alrededor de 1920 (37).

Para entender el origen del VIH fue importante el descubrimiento de que hay virus de inmunodeficiencia de los simios estrechamente relacionados con él y que están presentes en una gran variedad de primates africanos. El VIH-1 se relaciona más con el virus de la inmunodeficiencia de los simios chimpancés, el que, a diferencia de otros virus de inmunodeficiencia de simios, contiene un gen llamado *vpu* que también está presente en el VIH-1 (34, 38). 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% (38, 39).

### II.3. 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 (40).

## II.4. Estructura del virión.

La partícula viral del VIH tiene un diámetro de 100 nm, con una cápside icosaédrica. Presenta una envoltura en forma de bicapa lipídica, con 72 complejos glicoproteicos, formados por dímeros de gp41 y trímeros de gp120, que son necesarios para la unión y la penetración del virus a la célula hospedera. La gp120 contiene sitios de unión al receptor celular CD4 y a los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 8 (41, 42). La gp41 es una glicoproteína de transmembrana formada por los dominios alfa hélice HR1 y HR2, en cuyo extremo se localiza un péptido altamente hidrofóbico que interviene en la fusión de la envoltura del virus a la membrana de la célula. La nucleocápside contiene las proteínas p24, p7 y p6 que empaquetan dos moléculas de ácido ribonucleico (ARN) genómico y un cebador ARNt-Lys, además de las enzimas proteasa, transcriptasa inversa (TI) e integrasa (IN) (26) (Figura 1).

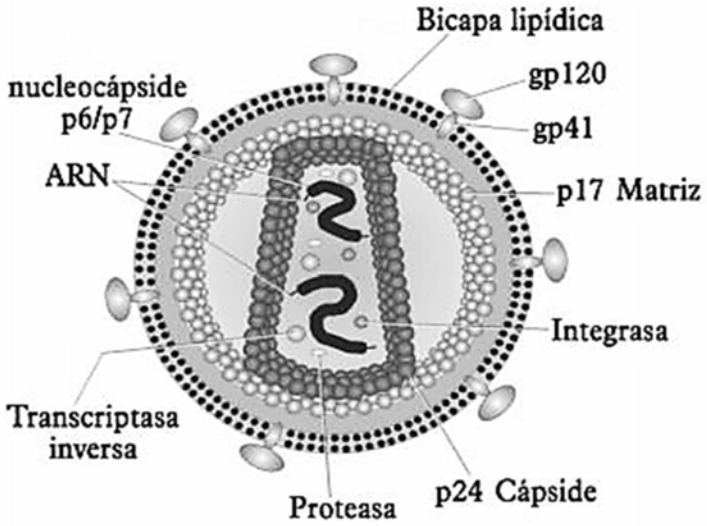



**Figura 1.** Estructura del VIH-1, que muestra las proteínas codificadas por los genes *gag, pol* y *env*. (26).

## II.5. Organización del genoma.

El genoma del VIH es lineal, constituido por 9,2 kilobases y se presenta de dos formas diferentes:

- Fase extracelular (virion): dos copias de ácido ribonucleico de simple cadena con polaridad positiva.
- Fase intracelular: doble cadena de ADN integrada al genoma celular.

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) (Figura 2). 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. En el VIH-2 el gen *vpu* se conoce como *vpx* (43, 44).

Los tres grandes genes estructurales se traducen inicialmente como precursores poliproteicos nombrados: Pr160Gag-Pol y Pr160Env.

El precursor Pr160Gag-Pol da origen al precursor Pr55Gag (55 kDa) mediante autocatálisis y acción de la proteasa contenida en el virión (42). Posteriormente, el Pr55Gag es procesado por la proteasa viral para originar las proteínas de matriz (MA, p17), cápside (CA, p24), nucleocápside (NC, p7) y la pequeña de 6 kDa (p6). Además, el precursor Pr160Gag-Pol da lugar a las tres enzimas del virus: la proteasa viral (10 kDa), el heterodímero Transcriptasa Inversa (subunidades p51 y p66) y la integrasa (32 kDa).

El precursor Pr160Env (160 kDa) se procesa pos-traduccionalmente , por enzimas celulares, en el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi dando lugar a las proteínas glicosiladas de la envoltura: la de superficie (SU) o gp120 (120 kDa) y la de transmembrana (TM) o gp41 (41 kDa) (26, 45). (Figura 2).

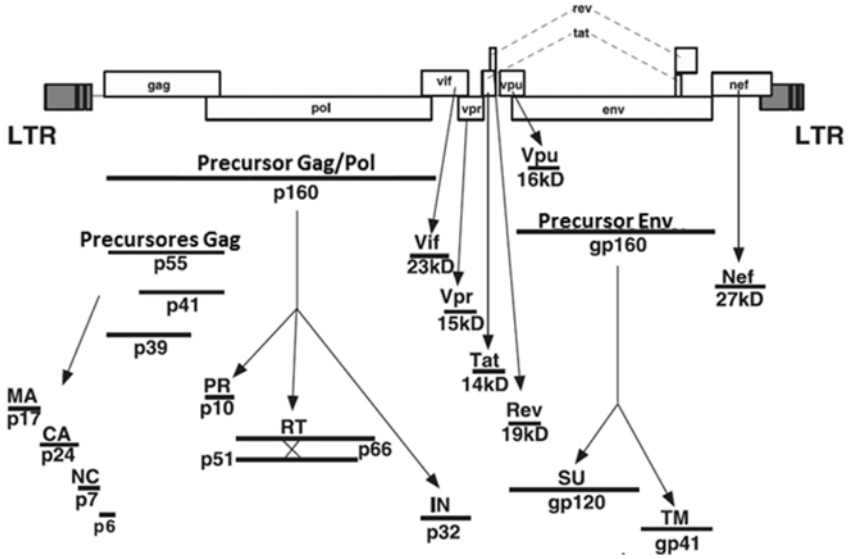



**Figura 2.** Organización del genoma del VIH-1. (26)

## II.6. Variabilidad genética y clasificación genotípica del VIH-1.

Inicialmente se pensó que el VIH-1 pudiera ser genéticamente homogéneo, así como se había observado en los otros retrovirus que fueron estudiados y descritos anteriormente. Sin embargo, cuando se compararon los ADN provirales correspondientes a aislamientos de VIH-1 procedentes de Europa, América del Norte y África se evidenció una extensa heterogeneidad genética: no hubo dos aislamientos del virus que fueran idénticos (46).

El mismo comportamiento se observó al realizar estudios de secuenciación nucleotídica a partir de muestras de pacientes infectados con el VIH-1, donde incluso muestras de un mismo paciente colectadas en tiempos diferentes exhibían variaciones significativas (47, 48).

Los cambios nucleotídicos están distribuidos a lo largo del genoma del VIH-1, aunque la mayor variabilidad ocurre en el gen *env,* donde están presentes las regiones hipervariables V1 a V5, intercaladas entre regiones relativamente conservadas C1 a C5 (49).

La tasa de mutación de los virus ARN, incluidos los retrovirus, se estima entre $10^{-3}$ a $10^{-5}$ sustituciones por nucleótido (s/nt) por cada ciclo de replicación. Esto se debe a la ausencia de la actividad correctora de errores (exonucleasa 3'- 5') de la TI y a la alta tasa de replicación viral. Las mutaciones puntuales pueden ser transiciones y transversiones (48).

Las variaciones genéticas también pueden ser originadas a través de inserciones y deleciones, por recombinación homóloga y no homóloga y por reordenamiento de segmentos en virus de genoma segmentado (50).

Las cuasi-especies son poblaciones de virus ARN que se replican como distribuciones complejas de genomas diferentes pero que están relacionadas genéticamente (51). También las describen como distribuciones dinámicas de genomas virales no idénticos pero muy cercanos genéticamente, que experimentan un proceso continuo de variación, competición y selección (52). Las cuasi-especies constituyen un reservorio de variantes virales. Presentan un rango amplio de fenotipos con respecto a la virulencia, el tropismo, la cinética de replicación y la composición antigénica (53, 54).

El tamaño poblacional es de gran importancia en la heterogeneidad genética. En cada célula infectada de un individuo seropositivo al VIH-1 pueden existir de $10^9$ a $10^{12}$ viriones, con un recambio de virus y de células infectadas muy elevado (55).

Los análisis filogenéticos basados en las secuencias de los genes *gag* y *env*, principalmente, clasifican al VIH-1 en cuatro grandes grupos (56): M (principal, del inglés main), O (externo, del inglés outlier), N (no M, no O, del inglés, non M, non O) y P (57). A su vez, del grupo M se divide en nueve subtipos que van del A al D, F, G, H, J y K. En los subtipos A y F se distinguen sub-subtipos designados como A1, A2, A3, A4 y F1, F2, respectivamente (58, 59).

La recombinación genética desempeña un papel esencial en la evolución y en la expansión geográfica de los subtipos. En el VIH-1 la recombinación se puede producir entre diferentes cepas del mismo subtipo (intra-subtipo), de distintos subtipos (inter-subtipo) o de diferentes grupos (inter-grupo) (60).

La generación de retrovirus recombinantes requiere que dos virus con genomas diferentes infecten una misma célula simultáneamente, a través de un episodio único de transmisión en forma secuencial, o en varios episodios. La recombinación entre los dos genomas diferentes encapsidados permite la generación de partículas heterocigóticas mediante saltos alternativos de la TI entre ambos genomas co-encapsidados (11).

Las formas recombinantes del VIH-1 están ampliamente distribuidas y se clasifican en FRC (formas recombinantes idénticas en al menos tres individuos no relacionados desde el punto de vista epidemiológico) y FRU (se encuentran en un único individuo o en individuos relacionados epidemiológicamente) (61-63).

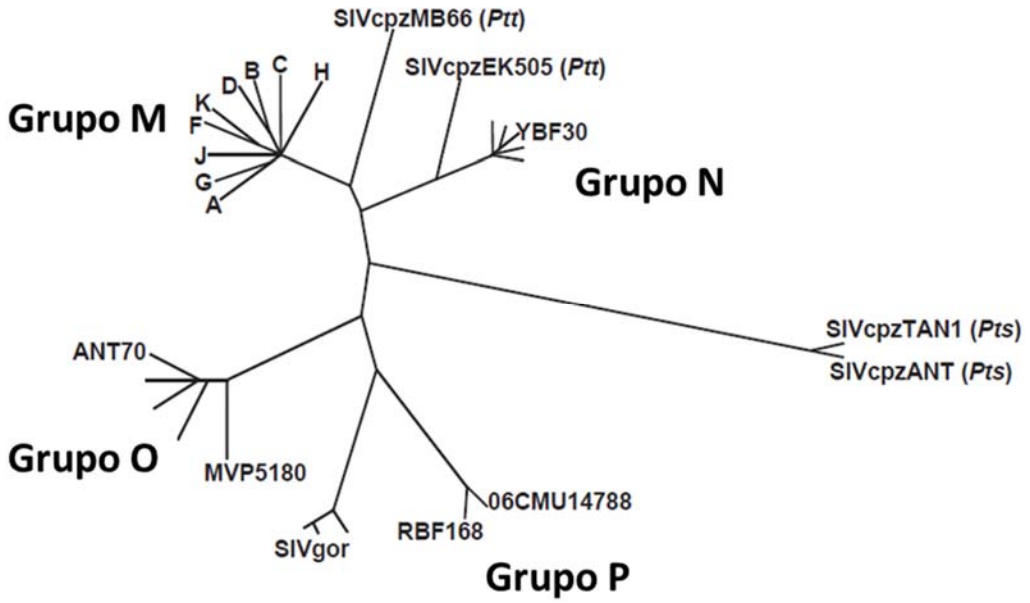



**Figura 3.** Clasificación genotípica del VIH-1. (26)

## II.7. Distribución mundial y regional de los subtipos del VIH-1

La distribución global de subtipos y recombinantes muestra una amplia distribución de subtipos a nivel mundial, con un notable incremento de las FRC y una disminución de las FRU. El grupo M incluye alrededor del 95 % de los aislamientos globales, dentro de este grupo el subtipo C representa cerca de la mitad del total de las infecciones con un 48% (64), seguido por el subtipo A (12%) y el B con un (11%), además de las formas recombinantes: FRC02_AG (8%), FRC01_AE (5%), el subtipo G (5%), y el D (2%) (65). Los subtipos F, H, J, K, en conjunto causan cerca del uno por ciento de las infecciones mundiales. Las FRC y FRU son responsables cada una del cuatro por ciento de las infecciones globales, las que unidas al resto de las FRC (FRC02_AG (8%), FRC01_AE (5%)), arrojan un 16 %, mientras que los recombinantes todos (FRC y FRU) representan un 20% (62, 63, 66).

En África Central se encuentra una gran diversidad viral con la presencia de todos los subtipos, así como de FRC y FRU. En África Occidental se detectan todos los subtipos, sin embargo, predominan la FRC02_AG y el subtipo G. La mayoría de la infecciones en África Oriental son debidas al subtipo A. En el sudeste de África, Etiopía y la India, la epidemia es exclusivamente causada por el subtipo C (66).

El subtipo B predomina en América del Norte, el Caribe, América Latina, Europa Central, Europa Occidental y Australia. En Europa Central y Occidental son detectadas muchas FRC y FRU. La epidemia en Europa Oriental y Asia Central es dominada por el subtipo A y B (67).

En el sur y sudeste de Asia la FRC01_AE es responsable de la mayoría de las infecciones. En el este de Asia, la epidemia se caracteriza por el predominio de la FRC07_BC, FRC08_BC, FRC01_ AE y el subtipo B. El norte y medio Oriente de África, está afectado mayoritariamente por el subtipo B y varias FRC (66).

Los miembros del grupo O se han obtenido de individuos de Cameroon, Gabon y Guinea Ecuatorial; su genoma comparte menos de un 50% de identidad en la secuencia nucleotídica con los virus del grupo M. Las cepas del grupo N, descubierto más recientemente, se han identificado en personas de Cameroon, cuyos anticuerpos no eran identificados en los ensayos de ELISA y sí eran detectados por análisis convencional de Western Blot (WB) (34, 68).

## II.8. Replicación del virus.

El ciclo de replicación del VIH se divide en dos fases; temprana y tardía (6) . En la primera fase se produce la adhesión, la entrada a la célula y el desnudamiento parcial de la partícula viral y continúa con la formación del provirus y su integración al genoma de la célula hospedera. En la segunda fase se produce la transcripción del ARN y la síntesis de las proteínas virales partiendo del ADN proviral, y termina con la liberación de los viriones desde la célula hospedera (6, 26, 69) (Figura 4).

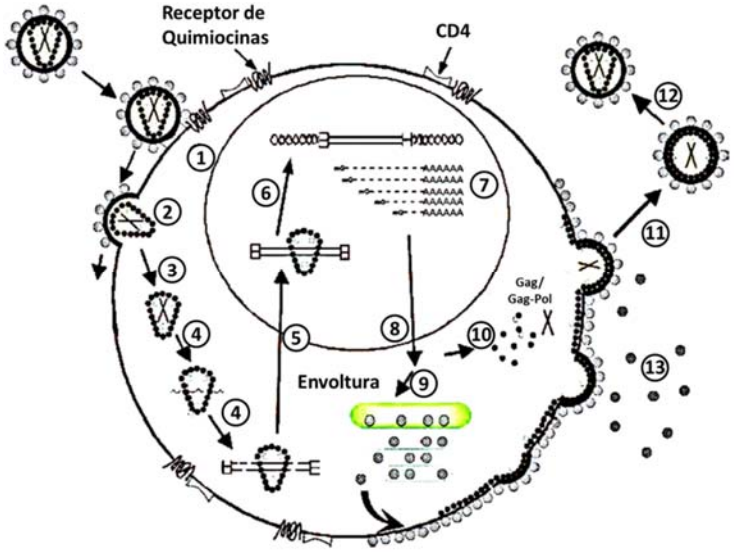



**Figura 4.** Etapas de la replicación del Virus de Inmunodeficiencia Humana. 1: Adhesión. 2: Entrada del virus a la célula. 3: Desnudamiento parcial de la partícula viral. 4: Transcripción reversa del ARN viral. 5: Transportación del ADN proviral hacia el núcleo de la célula. 6: Integración al ADN del cromosoma. 7: Transcripción del ADN viral. 8: Traducción del ARNm. 9 y 10: Transporte de las poli-proteínas de Envoltura y Gag+Gag-Pol por diferentes vías hacia la membrana plasmática. 11: Gemación de las partículas virales inmaduras. 12: Proteólisis de las poli-proteínas del virión para generar partículas virales maduras. 13: Desprendimiento de las glicoproteínas de envoltura gp120 no asociadas a virus (26)

La adhesión del virus a la célula huésped ocurre a través de la interacción de la proteína gp120 con la molécula CD4. Esta unión provoca un cambio conformacional en el complejo recién formado y se exponen otros grupos funcionales que interactúan con un correceptor celular, generalmente las moléculas CCR5 o CXCR4 (70). Después de esta interacción se producen nuevos cambios conformacionales en la molécula gp41, que permiten el anclaje del péptido de fusión a la membrana citoplasmática. Posterior a la fusión se libera la

cápside viral dentro del citoplasma de la célula con la liberación de las dos moléculas de ARN, y las enzimas virales (26, 71) (Figura 4).

La enzima TI realiza la síntesis del ADN proviral y sintetiza una hebra de ADN, dando lugar a la formación de un híbrido ADN/ARN. El ARN inicial se degrada por la subunidad ARNasaH de la TI y finalmente se sintetiza la otra hebra de ADN complementaria a la cadena recién producida (72, 73). Luego se produce la translocación del ADN proviral hasta el núcleo celular. En este proceso interviene el complejo de preintegración, formado por la doble hélice de ADN, la enzima integrasa y otras proteínas virales. A continuación se produce, la integración del genoma viral en el genoma celular y la célula se infecta de por vida (74, 75). Cada vez que se produzca la activación del linfocito infectado, mediante cualquier fenómeno inmunológico, se activará también la replicación viral, y por tanto, la producción de una nueva progenie viral infecciosa (26).

El ARN se sintetiza y se transporta al citoplasma donde tiene lugar la expresión de los genes virales. Este mismo ARN constituye el genoma viral. En la fase tardía se expresan los genes estructurales y se sintetizan las proteínas que forman parte del virión. Durante el ensamblaje, los precursores poliproteicos Pr55Gag, Pr160Gag-Pol y sus productos se agrupan y se asocian con la membrana citoplasmática alrededor del ARN genómico (76). Las proteasas virales y celulares digieren los precursores para formar las proteínas virales maduras y se produce el ensamblaje de las cápsides. La liberación del virus se realiza mediante gemación a través de la membrana citoplasmática, donde el virus incorpora la gp120, la gp41 y algunas proteínas celulares que formarán parte de su envoltura (26) (Figura 4).

### II.9. Receptores, correceptores de entrada del VIH-1 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 1α y MIP 1β. 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 (26, 77).

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 (78).

De acuerdo al efecto citopático los virus se clasifican en inductores (IS) y en 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 (79).

Refiriéndose al tropismo el VIH se clasifica por el uso de correceptores de quimiocina de la cepa viral predominante (26). Se observa una vinculación fuerte entre las cepas IS y los virus T-trópicos que infectan las células de la línea MT2, 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. 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 (26, 80, 81).

### II.10. 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 (Figura 5).

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 (6). 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 (69, 82).

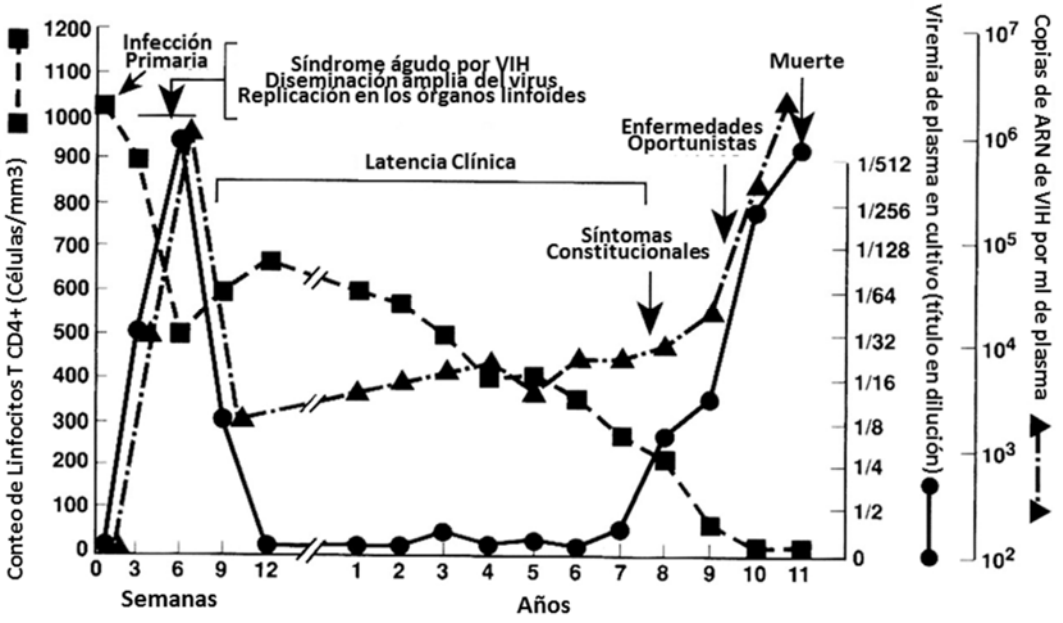



Figura 5. Representación esquemática de la historia natural de la infección por VIH (83).

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 (84). 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 (85, 86).

Después de la etapa de latencia clínica, el conteo de los linfocitos T CD4+ disminuye lentamente hasta descender por debajo de las 200 células/$mm^3$. Para este momento el sistema inmune ya no es capaz de controlar la replicación del VIH, por lo que la carga viral se eleva (6, 87). Esta etapa es la conocida como fase SIDA, y se acompaña de síntomas y

signos caracterizados por desórdenes inmunológicos, dermatológicos, hematológicos y neurológicos (69, 88). 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 (69, 87).

### II.11. Epidemiología.

Más de 37,9 millones de personas vivían con VIH-1 en el mundo, a finales del año 2018, de ellas 1,7 millones eran nuevas infecciones y 770 mil personas murieron por enfermedades relacionadas con el SIDA (89). Los datos epidemiológicos más recientes indican que la propagación del VIH a nivel mundial alcanzó su punto máximo en el año 1996, año en el que se contrajeron 3,5 millones de nuevas infecciones por el VIH. En consistencia con el período prolongado que transcurre entre la seroconversión de VIH negativo a VIH positivo y la enfermedad sintomática, la mortalidad anual relacionada con el VIH alcanzó su punto máximo en el 2004, año en el que se registraron 2,2 millones [1,9 millones–2,6 millones] de defunciones (www.unaids.org).

Las estimaciones epidemiológicas actuales reflejan la mejora constante de los sistemas nacionales de vigilancia del VIH y de la metodología de estimación. Las mejoras en los sistemas de vigilancia e información del VIH aportan un cuadro más claro y confiable de la epidemia a nivel nacional, regional y mundial (www.unaids.org). La epidemia parece haberse estabilizado en la mayoría de las regiones, aunque en Europa Oriental, Asia Central y otras partes de Asia, la prevalencia continúa en aumento. África Subsahariana aún es la región más afectada en la epidemia mundial y representa el 71% de todas las nuevas infecciones por el VIH en 2008. En todas las regiones las diferencias son obvias, y aunque la incidencia regional y global del VIH permanece estable, algunas epidemias nacionales continúan creciendo como es el caso de Cuba (www.unaids.org).

### II.12. Epidemiología en Cuba

Desde 1986 hasta el cierre del año 2018 habían 31 264 personas infectadas con VIH-1 en Cuba, alrededor de 2 200 son nuevos diagnósticos y el 86% estaban recibiendo la TARVAE. La prevalencia hasta la fecha es de 0,2%, la transmisión sexual es el factor de riesgo más frecuente y a ella corresponde el 99% de los casos descritos. La transmisión vertical, parenteral y la exposición ocupacional, constituyen otras causas de infección, con

mucha menor incidencia. El mayor número de casos son del sexo masculino, los que constituyen el 80 % de los casos y los hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) constituyen el 86%. La mayor incidencia de casos se reportan en individuos con edades entre los 15 y 49 años, según datos del Programa Nacional de Prevención y Control de las Infecciones de Transmisión Sexual VIH/SIDA del MINSAP (90).

Aunque la incidencia del VIH-1 en Cuba es baja, la epidemia se caracteriza por una diversidad genética viral inusualmente alta (15, 21). Los diferentes estudios realizados de la epidemia cubana han identificado los subtipos B, C, G, H, formas recombinantes circulantes BG (FRC20_BG, FRC23_BG y FRC24_ BG) y dos FRC complejas: la FRC18_cpx y la FRC19_cpx, que también se conocen como FRC cubanas. Algunos de estos subtipos fueron adquiridos en África en la década del 70 y del 80 (13, 20). El subtipo B representa sólo un tercio de la epidemia cubana, mientras que los recombinantes BG y la FRC19_cpx se están expandiendo actualmente en Cuba (12, 91).

### II.13. Terapia antirretroviral.

La TARVAE cambió la historia natural de la infección por VIH/SIDA, al retardar la evolución de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los individuos infectados. La infección por VIH-1 dejó de ser una enfermedad mortal a corto plazo para convertirse en una enfermedad crónica que puede tratarse (92).

En teoría, todas las etapas de la replicación del VIH pueden inhibirse. Los ARVs disponibles en la actualidad se agrupan en cinco clases o familias: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótidos (ITIANs), inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINANs), inhibidores de proteasa (IPs), inhibidores de la integrasa (IInt) y los bloqueadores de la entrada (92, 93). (Tabla 1).

El desarrollo de la TARVAE disminuye, de forma significativa, la morbi-mortalidad asociada a la infección por VIH-1, reduce la CV a niveles indetectables y restaura el sistema inmune lo que se evidencia por el aumento del conteo de linfocitos T CD4+ (94).

En el año 1987, con el empleo de AZT, un inhibidor de la TI, se inició el uso de la TARVAE. Este medicamento, utilizado como monoterapia, brindó resultados muy alentadores en esos primeros años (95, 96). Posteriormente, continuaron sintetizándose otros compuestos de esta familia como la Didanosina (ddI) y Estavudina (d4T) (97) y se demostró que el empleo de dos ARVs era mucho más efectivo que la monoterapia (98).

Tabla 1. Medicamentos ARVs aprobadas para uso clínico y sus mecanismos de acción.

| Clase. | Mecanismo de acción. | Fármaco (Abreviatura) |
|---|---|---|
| **1) ITIANs** | El blanco es la transcriptasa inversa del VIH. Actúan como sustratos alternativos. Son considerados terminadores de cadena que compiten con los nucleósidos fisiológicos en su incorporación a la cadena creciente de ADN proviral. Difieren de ellos sólo por una pequeña modificación en la molécula de ribosa. Interrumpen la síntesis del ADN al ser incorporados durante la transcripción reversa y requieren una fosforilación previa para activarse, son pro-drogas que deben ser convertidas en su forma trifosfatada por una enzima del hospedero celular (8). | • Zidovudina (AZT)<br>• Estavudina (d4T)<br>• Didanosina (ddI)<br>• Abacavir (ABC)<br>• Tenofovir (TDF)<br>• Lamivudina (3TC)<br>• Emtricitabina (FTC) |
| **2) ITINANs** | Se unen al bolsillo hidrofóbico en la enzima transcriptasa inversa, cercano al sitio activo. Inhiben alostéricamente la replicación del VIH, bloqueando el sitio de unión de la TI. | • Nevirapina (NVP)<br>• Efavirenz (EFV)<br>• Delavirdina (DLV)<br>• Etravirina (ETR)<br>• Doravirina (DOR)<br>• Rilpivirina (RPV) |
| **3) IPs** | Conducen a la liberación de partículas virales incapaces de infectar células nuevas ya que se unen al sitio activo de la proteasa del VIH, lo que evita el corte proteolítico y la maduración. | • Indinavir (IDV)<br>• Saquinavir (SQV)<br>• Atazanavir (ATV)<br>• Fosamprenavir (FPV)<br>• Lopinavir (LPV)<br>• Tipranavir (TPV)<br>• Darunavir (DRV)<br>/r: Todos los IP deben ser potenciados con ritonavir (RTV) |
| **4) Bloqueadores de la entrada** | *Inhibidores de Fusión:* Inhiben el cambio conformacional de gp41, necesario para la fusión del virus con la célula hospedera.<br>*Antagonistas de correceptores:* Compiten con el correceptor CCR5, bloqueando su sitio de unión a la gp120. | • Enfuvirtida (T20)<br>• Maraviroc (MVC) |
| **5) IInt** | Actúan en el proceso de integración, específicamente durante la transferencia del ADN proviral al cromosoma de la célula hospedera. También se les conoce como inhibidores de la transferencia de cadena. | • Raltegravir (RAL)<br>• Elvitegravir (EVG)<br>• Dolutegravir (DTG)<br>• Bictegravir (BIC) |

Abreviaturas: ITIANs: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, ITINANs: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, IP: Inhibidores de la proteasa, IInt: Inhibidores de la integrasa.

En el año 1995 se aprobaron los IPs, una clase de medicamentos completamente nueva, y que revolucionaron el tratamiento de la infección por el VIH. El Saquinavir (SQV) fue el primer IP descrito; seguido del Indinavir (IDV) y del Ritonavir (99). A partir de ese momento se publican los primeros resultados del empleo de la TARVAE, la cual consiste en la combinación de al menos tres ARVs que pertenecen o no a la misma familia de medicamentos (100). Los regímenes clásicos de TARVAE incluyen dos análogos de nucleósidos como tratamiento de primera línea (101).

### II.14. Nuevos medicamentos antirretrovirales.

Se conocen como nuevos medicamentos ARVs a un grupo de medicamentos que utilizan mecanismos novedosos de inhibición de la replicación del VIH (93). Hasta la fecha se aprobaron para su uso en humanos:

- Bloqueadores de la entrada: Se nombran en relación con la etapa que afectan (102, 103).
  - ✓ Inhibidor de la fusión: El T-20 (Enfuvirtide) es el prototipo de esta familia (104). Es un péptido sintético que inhibe el cambio conformacional de la gp41, necesario para la fusión del virus con la célula hospedera. Está compuesto por 36 aminoácidos, y debe ser administrado mediante una inyección subcutánea debido a su tamaño grande (105).
  - ✓ Antagonista de los correceptores. El Maraviroc es el prototipo de esta familia. Presenta actividad antiviral solo frente a virus R5-trópicos que utilizan el correceptor CCR5 para entrar en la célula (106). Es por eso que su prescripción requiere de un estudio previo del tropismo viral para excluir la presencia de virus X4-trópicos en la muestra del paciente infectado (107).
- Inhibidores de la integrasa: Se unen al sitio activo de la integrasa y bloquean la transferencia de cadena durante la integración de ADN proviral al ADN celular, que es un paso esencial en el ciclo de replicación del VIH (108).
  - ✓ Raltegravir (RAL): Es el primer medicamento de esta familia, aprobado para el uso en humanos (109, 110).
  - ✓ Elvitegravir Se plantea que es más potente que RAL (111). Sin embargo, se ha reportado que produce toxicidad inespecífica en células no infectadas(112).

- ✓ Dolutegravir (DTG): Es el primer inhibidor de la integrasa de segunda generación. La OMS recomienda su utilización como el inhibidor potente de la integrasa, tiene una barrera genética alta frente a la selección de la fármaco-resistencia (113, 114). El DTG es cada vez más asequible y está disponible en muchos países de ingresos bajos y medianos. Los países con niveles altos de resistencia a los ITINAN, superiores al 10%, pueden darle prioridad a su utilización antes del tratamiento (115, 116).
- ✓ Bictegravir (BIC): Es el último inhibior de la integrasa desarrollado y aprobado por la FDA, tiene una barrera genética elevada. Tanto el BIC como el DTG son recomendados por las guías de tratamiento para su utilización como terapia de primera línea en combinación con dos ITIAN (117, 118).

### II.15. Fallo a la terapia ARV:

El fallo a la TARAE es resultado de una o más de las siguientes fallas.

- ✓ **Fallo virológico:** Puede estar dada por una o más de las siguientes situaciones (226):
  - o Más de 400 copias /ml de CV a las 24 semanas de TARVAE.
  - o Más de 50 copias /ml de CV después de 48 semanas de TARVAE.
  - o Carga viral mayor de 400 copias/ml en dos determinaciones consecutivas después de haber logrado la supresión de la viremia. (“Rebote virológico”).
- ✓ **Fallo inmunológico:** Se define como falla inmunológica, al incremento inferior a 25-50 céls/mm3 por encima del CD4 basal, después de un año de tratamiento, o disminución por debajo del nivel basal estando en tratamiento (226).
- ✓ **Fallo clínico:** Se define como falla clínica, a la ocurrencia o recurrencia de eventos relacionados al VIH, después de por lo menos tres meses de TARVAE, excluyendo el síndrome de reconstitución inmune (226).

**Criterio para considerar respuesta correcta a la terapia:** Cuando la CV en plasma es menor de 50/20 copias/mL a las 16-24 semanas. Estos pacientes tienen respuesta virológica al mes (disminución mayor que 1log10/mL) y a las 12-16 semanas tienen una CV plasmática indetectables por la técnicas convencionales (231).

### II.16. Resistencia viral a la terapia.

El desarrollo de cepas resistentes de VIH es una de las principales razones para el fallo de la TARVAE. La resistencia puede ser adquirida a través de la presión ejercida por el

medicamento (resistencia adquirida) o transmitida de una persona a otra (resistencia transmitida). Los virus resistentes de manera natural son poco frecuentes, por lo que raramente se encuentran en pacientes no tratados ya que la mayoría de la resistencia son no polimórficas (1). Las mutaciones que confieren resistencia ocurren en los genes que codifican para las enzimas que son blancos de la terapia. Comprender los principios básicos de la resistencia a los medicamentos permite guiar a los médicos en la toma de decisiones clínicas individuales y en el desarrollo de guías para el tratamiento con los ARVs (8, 119).

Según el número de las mutaciones que se necesitan para el desarrollo de resistencia alta a un medicamento existen ARVs con barrera genética baja o alta. Para un medicamento con barrera genética baja basta con una mutación para que el virus desarrolle resistencia alta a un fármaco; como sucede con la NVP, el efavirenz (EFV) y la 3TC (120). Los ARVs con alta barrera genética requieren de la acumulación de tres o más mutaciones para que se produzca un alto grado de resistencia (121, 122).

Las resistencias pueden ser, además, clasificadas como primarias o secundarias. Las primeras se presentan en pacientes que nunca recibieron tratamiento antiviral, como por ejemplo la resistencia transmitida. Las segundas son las que se detectan en pacientes tratados, igualmente llamadas resistencias adquiridas (123).

En ocasiones, las mutaciones que se seleccionan como respuesta al tratamiento con un fármaco confieren pérdida de sensibilidad a otros ARVs de la misma familia y se conocen como mutaciones que causan resistencia cruzada.

Cuando se produce un cúmulo grande de mutaciones de resistencia a múltiples ARVs se limita el número de alternativas de regímenes terapéuticos, el éxito virológico de terapias siguientes y la solución de las llamadas “terapias de rescate” puede ser sólo transitoria (124).

### II.16.1. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos.

Existen dos mecanismos de resistencia asociados a los ITIANs:

- Mutaciones discriminatorias: permiten a la TI diferenciar entre el dideoxi-sintético y el natural, evitando la incorporación del ITIAN a la cadena de ADN viral que se está formando (M184V) (125, 126).

- Pirofosfolisis: las mutaciones que se desarrollan permiten la eliminación del trifosfato sintético que se adiciona a la cadena del ADN viral en formación. Las mutaciones que desencadenan este mecanismo se conocen como mutaciones asociadas a los análogos de timidina (TAMs, siglas del inglés, timidine associated mutations); porque se presentan en pacientes tratados con compuestos como la AZT y el d4T (M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y y K219Q)(8).

Existen dos mutaciones poco frecuentes que están asociadas con niveles altos de resistencia cruzada a los ITIANs: T69ins (inserción de dos aminoácidos en el codón 69), y la Q151M. La inserción 69 ocurre exclusivamente en combinación con múltiples TAMs y en este contexto, causa los altos niveles de resistencia a todos los ITIANs (8).

### II.16.2. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos.

Casi todas las mutaciones de resistencia a los ITINAN están dentro o adyacentes al bolsillo hidrofóbico cercano al sitio activo de la TI.

Los ITINANs tienen baja barrera genética de resistencia. La NVP generalmente requiere de una sola mutación, el EFV de una o dos mutaciones, y la ETR de dos o más.

Entre los no análogos existe un alto nivel de resistencia cruzada, debido a dos mecanismos: (I) la mayoría de las mutaciones de resistencia a los 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 no sean detectadas por los ensayos de resistencia (127).

### II.16.3. Resistencia a los inhibidores de la proteasa

La resistencia se desarrolla lentamente porque se debe a la acumulación de muchas mutaciones (121). Hay dos tipos de mutaciones: primarias y secundarias. Las mutaciones primarias se localizan en el sitio activo de la proteasa y disminuyen la afinidad del fármaco por la enzima. Las mutaciones secundarias no se localizan en el sitio activo y lo usual es que aparezcan después de producirse las mutaciones primarias. Estas mutaciones compensan la reducción de la actividad de la proteasa que ocasionan las mutaciones primarias y se conocen también como mutaciones accesorias (128). Las mutaciones primarias son: D30N, V32I, M46IL, G48VM, I50VL, I54VTALM, L76V, V82ATFS,

I84V, N88S y L90M. Las mutaciones primarias se conocen también como principales porque todas ellas causan niveles altos de resistencia a un IP (8).

### II.16.4. 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 (129).

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 (130). 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 (131). 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 (132, 133).

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 (102). 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 (134).

### II.16.5. Resistencia a los inhibidores de la integrasa.

La resistencia del VIH a los inhibidores de la integrasa (INI) 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 (135). 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 (136), 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 (137).

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 (138).

Los estudios VIKING y SAILOR identificaron otras mutaciones que se asocian con la resistencia al dolutgravir y que limitan la eficacia de la terapia: R263K, V151V/I, R263K, E138A/T, Y143H y E157E/Q (139, 140). Resulta muy interesante que la mutación R263K no se produce en el centro activo de la enzima, sino que se localiza en el extremo C terminal de la IN y produce resistencia mediante un mecanismo que todavía no se conoce (141).

## II.17. Ensayos genotípicos para la determinación de la resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales

Detectan mutaciones de resistencia en las enzimas que son blancos de la TARVAE. Las pruebas genotípicas se emplean con más frecuencia que las fenotípicas debido a cuestan menos, requieren menos tiempo para su realización y son más potentes para detectar la resistencia desarrollada (8) y se basan en el análisis del genoma. Las técnicas que utilizan la secuenciación detectan todas las mutaciones presentes en las regiones del genoma del VIH-1 que codifican para los blancos de la TARVAE (142).

La sensibilidad de las pruebas de resistencia genotípica fluctúan en un rango de 100 a 1 000 copias de ARN en plasma por mL del VIH-1, dependiendo de la prueba utilizada (8).

La literatura describe la existencia de una correlación entre la presencia de mutaciones que confieren resistencia y la pérdida de la eficacia antiviral, lo que permite considerarlas un marcador precoz de fallo terapéutico, aún antes de que ocurra una elevación de la carga viral (126).

Las mutaciones se reportan 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 se encontró en la secuencia estudiada (8).

El conjunto de mutaciones en la secuencia se examina para identificar aquellas mutaciones conocidas que se asocian con una disminución de la susceptibilidad a la TARVAE. Este proceso se realiza mediante sistemas automatizados de interpretación de la resistencia genotípica. Existen alrededor de diez sistemas de interpretación que se utilizan comúnmente, aproximadamente la mitad están disponibles sin costo en Internet.

Muchas mutaciones no causan resistencia por sí mismas, pero indican la presencia de la presión selectiva de la droga y sugieren que la población viral presente en el paciente está evolucionando hacia la resistencia (8).

Las pruebas de resistencia son de gran importancia en el manejo y seguimiento de la TARVAE, aunque la falla del tratamiento requiere de la consideración de otros factores causales. Es necesario enfatizar que sólo los médicos con experiencia en el tratamiento del VIH deberían iniciar, interrumpir o cambiar la TARVAE y hacerlo, teniendo en cuenta, la situación clínica y el contexto psicosocial del paciente, además del resultado bien interpretado de las pruebas de resistencia (219).

Otro aspecto a tener en cuenta para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas es el conocimiento de la variabilidad genética del VIH-1 que incide en la exactitud de las pruebas diagnósticas, la determinación de la carga viral y los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 a la TARVAE. Además, la susceptibilidad de los diferentes subtipos del VIH-1 a los ARVs es objeto de mucha atención, incrementándose mundialmente, cada vez más, las investigaciones de secuenciación de subtipos no- B.

### II.17.1. Plan de acción mundial 2017-2021 sobre la fármaco-resistencia del VIH.

La OMS durante su 69 Asamblea Mundial de la Salud, en el año 2017, planteó poner fin a la epidemia de SIDA para el año 2030. Para lograr este objetivo propuso que en el año 2020, el 90% de las personas que vivan con el VIH conozcan su estado serológico, que el 90% de las personas diagnosticadas con el VIH reciban la TARVAE continuada y que el 90% de las personas que reciben la TARVAE tengan supresión viral. Cuando se alcance el triple objetivo 90-90-90, el 72,9% de las personas que viven con el VIH en todo el mundo tendrán supresión viral (143, 144).

Los ensayos genotípicos de resistencia son imprescindibles para que se logre la supresión viral de las personas bajo TARVAE. Estos ensayos permiten guiar de manera efectiva la terapia del paciente y fortalecer la vigilancia de la resistencia a los ARVs en los países,

teniendo una gran influencia en las estrategias de tratamiento que permitan que la TARVAE sea óptima (119).

A partir del compromiso de los países de cumplir la estrategia 90-90-90 para el año 2020 y del compromiso global de detener la epidemia de SIDA para el año 2030, la OMS trazó el Plan de Acción Global (PAG) sobre la resistencia del VIH a los ARVs en el año 2017. La meta de este plan de acción es articular las medidas necesarias para evitar que la resistencia del VIH-1 a los medicamentos menoscabe los esfuerzos realizados para alcanzar los objetivos mundiales en cuanto a la salud y el VIH. Además, proporcionar el tratamiento más eficaz a todas las personas infectadas, incluidos los adultos, los grupos de población clave, las mujeres durante el embarazo y la lactancia, los niños y los adolescentes (145, 146).

El plan de acción mundial tiene cinco objetivos estratégicos:

1. Prevención y respuesta, que propone implementar intervenciones de alto impacto para prevenir y responder a la resistencia del VIH-1 a los ARVs.
2. Seguimiento y vigilancia, que pretende el monitoreo y la vigilancia adecuada de la resistencia para obtener datos de calidad en estudios periódicos y expandir las pruebas de CV.
3. Investigación e innovación, que aborda la promoción de investigaciones innovadoras que tengan un impacto en minimizar la resistencia.
4. Capacidad de laboratorio, que pretende incrementar la disponibilidad de las pruebas de CV y optimizar el monitoreo de la resistencia.
5. Gobernanza y mecanismos facilitadores, que va dirigido a asegurar el empoderamiento de los países, la acción coordinada y los fondos sostenibles para apoyar las acciones de la prevención de la resistencia.

La resistencia del VIH a los ARVs se asocia a una mala evolución clínica y a una reducción de la efectividad de los ARVs. A medida que se continúe ampliando la cobertura del tratamiento para el VIH, la comunidad mundial deberá estar atenta al surgimiento de la resistencia y a la urgente necesidad de proteger la efectividad de los ARVs que existen actualmente y de los nuevos que se introduzcan. Todos los ARVs actuales, incluidos los de las clases más nuevas, corren el riesgo de convertirse en parcialmente activos o plenamente inactivos, como consecuencia de la aparición de resistencia (147).

La resistencia del VIH a los ARVs se clasifica en tres categorías, según el nuevo PAG y en dependencia del momento de adquisición (143, 147, 148):

- Resistencia Adquirida (RA): aparece cuando surgen mutaciones del VIH como consecuencia de la replicación viral en las personas que reciben ARVs.
- Resistencia Transmitida (RT): Se detecta en personas que no tratadas anteriormente con ARVs y que no tienen antecedentes de exposición a dichos medicamentos y que sufren una infección por un virus que tiene las mutaciones de fármaco-resistencia.
- Resistencia Previa al Tratamiento (RPT): Se detecta en personas no tratadas anteriormente con ARVs que inician una TARVAE, o en personas con una o varias exposiciones previas a ARVs que inician o reinician un TAR de primera línea. La RPT es una fármaco-resistencia transmitida, adquirida o de ambos tipos:

  a) transmitida en el momento de la infección (RT).

  b) adquirida como consecuencia de una o varias exposiciones previas a medicamentos ARVs sin haberse producido fallo virológico documentado (RA). Puede ocurrir en el caso de las mujeres expuestas a ARVs para la prevención de la transmisión materno-infantil (PTMI) del VIH, en personas que recibieron una profilaxis previa a la exposición (PrEP), o en personas que reinician un TAR de primera línea después de un período de interrupción del tratamiento.

La prevalencia alta de resistencia del VIH a los ARVs deteriora la respuesta de la salud pública al tratamiento de la infección por el VIH y obstaculiza el logro de la meta mundial de poner fin a la epidemia de SIDA. En el informe de la OMS del año 2017 sobre la resistencia del VIH a los ARVs se pone de manifiesto el aumento constante de la prevalencia de la resistencia desde el año 2001 en las personas que inician la TARVAE de primera línea (143, 147, 148).

Los resultados de los estudios aleatorios controlados realizados hasta la fecha demuestran que el elemento que más repercute en la disminución de la incidencia de nuevas infecciones por VIH es la TARVAE (149). Los estudios PARTNER y HPTN describieron la no transmisión del VIH en parejas homosexuales o heterosexuales sero-discordantes, tras mantener relaciones sexuales cuando la persona que vive con el VIH se encuentra bajo TARVAE y tiene supresión viral (150, 151).

# III. MATERIALES Y MÉTODOS

# III. MATERIALES Y MÉTODOS

## III.1. Diseño del estudio.

Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal para determinar el subtipo viral y las mutaciones asociadas a la resistencia a los ARVs en muestras procedentes de individuos cubanos seropositivos al VIH-1. El estudio se realizó entre abril del año 2009 y diciembre del 2014 en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK, La Habana, Cuba).

## III.2. Criterios de inclusión y de exclusión.

Los médicos de asistencia incluyeron a todos los pacientes tratados que evidenciaron fallo terapéutico y a todos los individuos no tratados con evolución clínica atípica. Se basaron en los criterios virológicos, inmunológicos y clínicos que justificaron dicha clasificación. Se excluyeron los pacientes que no tenían datos clínicos recientes al momento de solicitar la prueba de resistencia, aquellos que sus muestras no se extrajeron o conservaron adecuadamente y los diagnosticados con VIH-2 o co-infección VIH-1/VIH-2. **III.3.**

## Evaluación de un ensayo genotípico <u>in-house</u> para la determinación de la variante genética de VIH-1 y la resistencia a los antirretrovirales en muestras de pacientes cubanos.

### III.3.1. Muestras Clínicas.

Se confeccionaron cuatro paneles de muestras, las cuales se escogieron cuidadosamente, de manera tal que la distribución general de los subtipos virales de cada panel reflejara la diversidad genética de la epidemia cubana de VIH-1. Además, se seleccionaron muestras de plasma que mostraran un rango amplio de cargas virales y perfiles complejos de resistencia a los ARVs.

Para determinar el LIA se seleccionaron 20 muestras de plasma de pacientes seropositivos al VIH-1, cuyos subtipos o variantes genéticas se conocían y que estaban conservadas en el Laboratorio de ITS del Departamento de Virología del IPK. Se incluyeron dos muestras del subtipo A, cuatro del B, cuatro del C, cuatro de la FRC18_cpx, cuatro de la FRC19_cpx y dos recombinantes BG.

Para evaluar la fidelidad (sensibilidad y especificidad) del ensayo, se utilizó un panel externo constituido por 14 muestras de plasma de pacientes infectados con VIH-1. El Hospital Universitario de Lovaina (Bélgica) donó el panel, que incluyó dos muestras del

subtipo A, cuatro del B, una del C, una del D, una del G, una del H, una de la FRC02_AG y tres de FRU. Las muestras tenían cargas virales en el rango de 692 a 263 027 copias de ARN/mL y múltiples patrones de resistencia que incluían mezclas de nucleótidos en posiciones asociadas a resistencia a los ARVs. Estas muestras fueron clasificadas mediante el ensayo ViroSeq HIV-1 genotyping system version 2.0 (Celera, Alameda, CA, USA; Abbott Molecular, Wavre, Belgium).

Para determinar la precisión (repetitividad y reproducibilidad) del ensayo, se utilizaron dos paneles, de cinco muestras cada uno, que consistieron en muestras de plasma de pacientes infectados con VIH-1 con múltiples patrones de resistencia y varios subtipos. Dichas muestras se conservaron en el Laboratorio de ITS del Departamento de Virología del IPK. Se incluyeron dos muestras del subtipo B, dos del C, dos de la FRC18_cpx, una de la FRC19_cpx, una de la FRC20_BG y dos de la FRC24_BG.

Para evaluar la aplicación del ensayo "in-house" en muestras clínicas, se utilizaron 380 muestras de plasma de todos los pacientes infectados con VIH-1 que asistieron al IPK entre abril del año 2009 y septiembre del 2011 con indicación de una prueba de resistencia. Se utilizaron una o dos muestras de un mismo paciente, en dependencia de su respuesta a la TARVAE después de realizarse el cambio de tratamiento basado en los resultados de las pruebas de resistencia. Se incluyeron 92 muestras de plasma de 88 pacientes no tratados, 220 de 196 pacientes con fallo a la TARVAE y 68 muestras de igual número de pacientes con historial terapéutico desconocido.

### III.3.2. Ensayo in-house para la determinación del genotipo.

#### III.3.2.1 Diseño de los cebadores.

Los cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y de la secuenciación nucleotídica se diseñaron utilizando un alineamiento del gen *gag-pol* de las variantes del VIH-1 del grupo M disponibles en la base de datos de Los Álamos (www.hiv.lanl.gov). Además, se tuvo en cuenta la variabilidad genética alta del VIH-1 que se reportó en estudios anteriores en Cuba y la ausencia de codones asociados a resistencia. Por último, se consideró el promedio de la longitud de los fragmentos de secuencia que se obtienen con el secuenciador automático disponible en el IPK (CEQ 8800 Genetic Analysis System (Analis, Namen, Belgium)). Se incluyeron en el alineamiento las secuencias de todas las variantes disponibles de las formas recombinantes más frecuentes en Cuba: FRC18_cpx,

FRC19_cpx, FRC(20,23,24)_BG (15). Además, los cebadores se evaluaron utilizando la herramienta informática OLIGO software (Medprobe, Oslo, Norway) y se modificaron en los casos en que fue necesario. Se sintetizaron por la compañía Life Technologies (Gent, Belgium) (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores diseñados para la amplificación y secuenciación de la proteasa y la transcriptasa inversa del VIH-1.

| Cebador | Secuencia 5'-3' | Posición[a] | Dirección | Descripción |
|---|---|---|---|---|
| **AV159*** | GGGGTTAAATAAAATAGTAAG | 1 593 | Sentido | Amplificación |
| **AV192** | AATTGTTTTACATCATTAGTGTG | 3 630 | Antisentido | Amplificación |
| **AV190** | GCTACACTAGAAGAAATGATGAC | 1 810 | Sentido | Amplificación |
| **AV191** | CTTGATAAATTTGATATGTCCATTG | 3 555 | Antisentido | Amplificación |
| **KVL162** | TTCCCTCARATCACTCTTTGGCA | 2 250 | Sentido | Secuenciación |
| **KVL164** | ACCAGTAAAAYTRAARCCAGGAATG | 2 573 | Sentido | Secuenciación |
| **KVL163** | CACAGGGATGGAAAGGRTCACC | 2 998 | Sentido | Secuenciación |
| **KVL177** | AARGAMAGCTGGACTGTCAATGA | 3 294 | Sentido | Secuenciación |
| **KVL165** | GTRTTRTATGGATTTTCAGGCCCAA | 2 698 | Antisentido | Secuenciación |
| **KVL176** | TTGYTCTATGYTGCCCTATTTCTA | 3 127 | Antisentido | Secuenciación |
| **KVL178** | CTATTAAGTCTTTTGATGGGTCATA | 3 504 | Antisentido | Secuenciación |

[a] Posición de acuerdo a la secuencia de la cepa HXB2 (Número de acceso a GenBank K03455). A: Adenina. T: Timina. G: Guanina. C: Citosina. R: Mezcla de Adenina y Guanina. Y: Mezcla de Citosina y Timina. M: Mezcla de Adenina y Citosina. *Este cebador se describió anteriormente por Van Laethem y cols en el año 2006 (152).

#### III.3.2.2 Extracción del ARN.

La dilución seriada del plasma en tampón fosfato salino o un mililitro de plasma se ultra-centrifugó a 20 000 x g durante una hora a 4˚C para precipitar las partículas virales. Se descartó el sobrenadante (860 µL), y los 140 µL restantes se utilizaron para disolver el precipitado. Posteriormente, se realizó la extracción del ARN de forma manual utilizando el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) y se siguió el procedimiento indicado por el fabricante. La elución del ARN extraído se realizó en 60 µL de tampón de elución y se almacenó a -80 ˚C hasta su utilización.

#### III.3.2.3 Amplificación.

Se utilizaron diez microlitros del ARN extraído a los que se realizó una reacción de transcripción reversa seguida de una amplificación en un solo paso. Para esto, se utilizó el sistema enzimático SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity kit (Life Technologies, Gent, Belgium). La mezcla de la reacción estuvo compuesta por: 25 µL del tampón 2X Reaction Mix (0,4 mM de cada dNTP y 2,4 mM de $MgSO_4$), 0,5 µL del cebador AV159 a 20 µM, 0,5 µL del cebador AV192 (Tabla 2) a 20

μM. A continuación se adicionaron 8 μL de $MgSO_4$ a 5 mM, 1μL de SuperScript III RT/Platinum Taq High Fidelity Enzyme Mix, 0,25 μL de Protector RNase Inhibitor (Roche, Mannheim, Germany) a 40 U/μL y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 40 μL.

La transcripción reversa se realizó a 55˚C por 30 minutos. Para la amplificación se utilizó un programa de ciclado de temperatura que comenzó con una desnaturalización inicial a 94˚C por dos minutos. Posteriormente se realizaron 40 ciclos de: desnaturalización a 94˚C por 15 segundos, hibridación a 50˚C por 30 segundos y extensión a 68˚C por dos minutos; con una extensión final a 68˚C por cinco minutos. Como resultado de esta TR-RCP se obtuvo un producto amplificado de 2 060 pb.

Se realizó una RCP anidada, para la cual se utilizó el sistema enzimático Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim, Germany). Este sistema tiene una enzima con actividad exonucleasa 3´- 5´; por tanto, las mezclas se prepararon en dos tubos separados para prevenir la degradación de los cebadores y del ADN molde. Al primer tubo se adicionaron 0,4 μL de cada dNTP a 25 mM, 1,25 μL del cebador AV190 (Tabla 2) a 20 μM, 1,25 μL del cebador AV191 (Tabla 2) a 20 μM y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 23 μL. Al segundo tubo se añadieron 5 μL del tampón 10X Expand High Fidelity Buffer, 6 μL de $MgCl_2$ a 25 mM, 0,75 μL de la enzima Expand High Fidelity Enzyme Mix a 3,5 U/μL y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 μL. Posteriormente, se adicionaron dos microlitros del producto de la RCP externa al primer tubo e inmediatamente antes de comenzar el programa de ciclado de la temperatura se añadieron los 25 μL de la segunda mezcla de la RCP a cada tubo de reacción.

Para la RCP anidada se utilizó un programa de ciclado de temperatura que comenzó con una desnaturalización inicial de 95 ˚C durante dos minutos. A continuación se realizaron 30 ciclos de desnaturalización a 95 ˚C por 30 segundos, hibridación a 50 ˚C por 30 segundos y extensión a 68 ˚C por dos minutos; con una extensión final a 68 ˚C por cinco minutos. Como resultado de esta RCP anidada se obtuvo un fragmento interno de 1 770 pb.

Todos los programas de ciclado de temperatura se realizaron en un termociclador Doppio Thermocycler (VWR, Leuven, Belgium).

Los productos de la amplificación se separaron realizando una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (0,4 M de Tris; 0,5 M de ácido bórico y 0,01 M de

ácido etilendiaminotetracético (EDTA)). Posteriormente se les realizó una tinción con bromuro de etidio y se visualizaron los productos con una lámpara de luz ultravioleta en un transiluminador (Analitikjena, Alemania).

### III.3.2.4 Secuenciación nucleotídica.

Los productos de la RCP se purificaron utilizando el estuche comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. La secuenciación nucleotídica bidireccional se realizó a los productos purificados de la RCP utilizando el estuche comercial Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (Analis, Namen, Belgium).

Se realizaron siete reacciones separadas, cada una con un cebador diferente, con el propósito de secuenciar un fragmento de 1 302 pb que codifica para los 99 aminoácidos de la PR y los primeros 335 aminoácidos de la TI del VIH-1. Cada mezcla consistió en 1 µL de los cebadores: KVL162, KVL163, KVL164, KVL165, KVL176, KVL177 o KVL178 (Tabla 2) a 5 µM, 8 µL de la mezcla principal de enzima Quick Start DTCS Master Mix, 5 µL del producto purificado de la RCP y 6 µL de agua libre de nucleasas, para completar un volumen final de reacción de 20 µL.

La reacción de secuencia consistió de 50 ciclos de desnaturalización a 96 ˚C por 30 segundos, hibridación a 50 ˚C por 20 segundos y extensión a 60 ˚C por cuatro minutos.

Los productos de la secuenciación se purificaron de acuerdo con el protocolo descrito en el estuche comercial DTCS Quick Start Kit. Los fragmentos generados se separaron en un secuenciador CEQ 8800 Genetic Analysis System (Analis, Namen, Belgium).

Los electroferogramas se visualizaron, y las secuencias se ensamblaron y se editaron manualmente utilizando el programa informático Sequencher versión 4.10.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA). La secuencia de la cepa HXB2 de VIH-1 del subtipo B se utilizó como referencia (Número de acceso al GenBank: K03455).

#### III.1.2.4.1 Determinación del subtipo.

La determinación del subtipo viral se realizó utilizando la herramienta Rega subtyping tool version 3 (153) y se confirmó mediante un análisis filogenético manual utilizando el programa CLUSTAL-X y el método de unión por vecindad en el programa MEGA versión 5 (Kimura's 2-parameter correction, bootstrap 1000) (154). La asignación de las formas recombinantes se realizó utilizando el programa Simplot versión 2.5 (155).

Se incluyeron como secuencias de referencia de subtipos puros (número de acceso a Genbank) las siguientes:

Subtipo: A (AM000055, AM000053), B (AY037269, DQ383746, K03455), C (AY563170, AY727522), D (K03454, M27323), F (DQ189088, AF077336), G (AF084936, AY371121), H (AF190127, AF190128, AF005496), J (EF614151, AF082394, AF082395), K (AJ249235, AJ249239).

Además, se incluyeron como secuencias de referencia de formas recombinantes: (AF286236, AF457101), FRC01_AE (AF197340, U51188), FRC02_AG (AY371122, AY371123), FRC18_cpx (AF377959, AY586541, AY894993, AY586540), FRC19_cpx (AY588971, AY588970, AY894994), FRC20_BG (AY586545, AY586544), FRC23_BG (AY900571, AY900572) y FRC24_BG (AY900574, AY900575).

**III.1.2.4.2 Determinación de la resistencia a los medicamentos antirretrovirales.**

Las posiciones aminoacídicas que se utilizan para vigilancia de las mutaciones de resistencia a los ARVs se definieron de acuerdo a las mutaciones publicadas por Bennett y cols. (156).

Las posiciones relacionadas con las mutaciones de resistencia a los ARVs se definieron como los cambios aminoacídicos que se incluyen en los algoritmos de interpretación de la resistencia de las bases de datos Rega v9.1.0, ANRS 2013.09 y HIVDB v7.0, la interpretación de la resistencia a los medicamentos se llevó a cabo utilizando el sitio web de Standford (http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=algSequenceInput).

**III.1.2.4.3 Control de Calidad.**

Para chequear la contaminación cruzada o la confusión de las muestras se incluyó un control negativo en cada corrida de extracción, amplificación y secuenciación. Además, se comprobaron las secuencias utilizando el programa Calibrated Population Resistance tool version 6.0 (http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi) y se realizaron las reconstrucciones filogenéticas de todas las secuencias generadas, que incluyeron los subtipos y las FRC del VIH-1 contenidas en la versión del 2008 de la base de datos de Los Álamos (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html). Las secuencias se alinearon utilizando el programa Muscle en la plataforma MEGA version 5.0. Las posiciones aminoacídicas que se utilizan para vigilancia de las mutaciones de resistencia a los ARVs (156) se eliminaron del alineamiento para evitar los sesgos de la evolución

convergente (157). Se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando el programa RAxML v7.8.1 (158) con el modelo de sustitución nucleotídica GTR+r (Anexo 4). Se evaluó la robustez de la topología del árbol mediante un análisis de bootstrap con 1 000 réplicas. La representación gráfica del árbol filogenético se trazó utilizando FigTree v1.4.0.

**III.3.3. Evaluación de la resolución del ensayo in-house.**

Para validar el ensayo genotípico in-house se utilizó la definición general de resolución propuesta por Jenning y cols. del año 2009. Se evaluaron las características de resolución del ensayo, que consistieron en: determinación del límite inferior de amplificación (LIA), evaluación de la exactitud (fidelidad y precisión) y se evaluó la aplicación del ensayo en muestras clínicas(159).

**III.3.3.1 Determinación del límite inferior de amplificación.**

Se definió el LIA como la mayor dilución de la muestra en la cual el ácido nucleico del virus puede ser amplificado. Se utilizaron tres réplicas de 20 muestras de diferentes subtipos y formas recombinantes frecuentes en Cuba. A las réplicas de las muestras de plasma se les realizaron diluciones seriadas en base diez en tampón fosfato salino hasta llegar a una carga viral teórica inferior a 1 000 copias de ARN/mL. La extracción y amplificación del ARN que contenían las diluciones seriadas se realizó utilizando el ensayo in-house descrito en el Acápite III.1.

A la última dilución seriada que se consideró positiva se le realizó diluciones seriadas en base dos, hasta alcanzarse una carga viral teórica inferior a las 100 copias de ARN/mL. La extracción y amplificación del ARN de cada dilución también se realizó utilizando el ensayo in-house descrito en el Acápite III.1.

El procedimiento se consideró exitoso si el producto amplificado podía visualizarse en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en transiluminador (Analitikjena, Alemania) con una lámpara de luz UV.

Se determinó la media del valor de la carga viral teórica de las tres réplicas de cada muestra que se utilizó. El LIA debía ser menor o igual a 1 000 copias de ARN/mL, que es el valor de corte recomendado por la OMS para la realización de las pruebas de resistencia del VIH-1 a los ARVs (160)

### III.3.3.2 Evaluación de la fidelidad del ensayo.

No existe un método de referencia para los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 a los ARVs. Por tanto, se evaluó la fidelidad mediante la comparación de los resultados obtenidos utilizando el ensayo in-house con los que se obtuvieron con el ensayo ViroSeq Genotyping System versión 2.0.

Se determinó la mediana del grado de identidad nucleotídica entre los resultados que se obtuvieron por ambos ensayos y se calcularon la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, como medidas de la fidelidad. Para esto, se definieron los conteos Verdaderos Positivos, Falsos Positivos, Verdaderos Negativos y Falsos Negativos.

**Verdaderos Positivos (VP):** Se consideraron verdaderos positivos los cambios aminoacídicos correspondientes a las mutaciones de resistencia (126, 156) que se detectaron utilizando ambos ensayos genotípicos.

**Falsos Positivos (FP):** Se consideraron falsos positivos los cambios aminoacídicos correspondientes a las mutaciones de resistencia (126, 156) que se detectaron utilizando el ensayo genotípico "in-house" pero no se detectaron utilizando el ensayo genotípico ViroSeq.

**Verdaderos Negativos (VN):** Se consideraron verdaderos negativos todas las posiciones en las que no se detectaron mutaciones de resistencia (126, 156) mediante el ensayo genotípico "in-house" y tampoco se detectaron mutaciones mediante el ensayo genotípico ViroSeq.

**Falsos Negativos (FN):** Se consideraron falsos negativos los cambios aminoacídicos correspondientes a las mutaciones de resistencia (126, 156) que se detectaron utilizando el ensayo genotípico ViroSeq, pero no se detectaron utilizando el enzayo genotípico "in-house".

La sensibilidad se definió como la probabilidad de clasificar correctamente un cambio aminoacídico como una mutación de resistencia al utilizarse el ensayo genotípico "in-house". Se determinó utilizando la siguiente fórmula matemática:

$$\boldsymbol{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

La especificidad se definió como la probabilidad de clasificar correctamente una posición aminoacídica en la que no se observaron mutaciones de resistencia mediante el ensayo ViroSeq. La especificidad se calculó utilizando la siguiente fórmula matemática:

$$\boldsymbol{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

Los valores predictivos positivo y negativo se utilizaron para medir la eficacia real del ensayo genotípico "in house".

El valor predictivo positivo (VPP) se definió como la probabilidad de detectar una mutación de resistencia utilizando el ensayo genotípico "in-house" en las posiciones que se detectaron mutaciones de resistencia utilizando el ensayo genotípico comercial ViroSeq. El VPP se determinó utilizando la siguiente fórmula matemática:

$$\boldsymbol{Valor\ Predictivo\ Positivo} = \frac{VP}{VP + FP}$$

El valor predictivo negativo (VPN) se definió como la probabilidad de detectar la ausencia de mutaciones de resistencia a los ARV utilizando el ensayo genotípico "in house" en las posiciones que el ensayo comercial ViroSeq no detectó mutaciones. El VPN se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\boldsymbol{Valor\ Predictivo\ Negativo} = \frac{VN}{VN + FN}$$

El criterio de aceptación para la fidelidad del ensayo genotípico "in-house" se estableció como una concordancia nucleotídica igual o mayor al 95%. El criterio de aceptación a nivel aminoacídico se definió como una identidad mayor o igual al 99% en las posiciones asociadas a mutaciones de resistencia a los ARVs, si no había presencia de mezclas de nucleótidos; y mayor o igual al 50% si en la secuencia de referencia estándar había mezclas de nucleótidos (161, 162).

#### III.3.3.3 Evaluación de la precisión del ensayo in-house.

Se evaluó determinando la repetitividad y la reproducibilidad. El criterio de aceptación para la repetitividad y reproducibilidad se definió como una identidad nucleotídica ≥98% en más del 90% de las comparaciones (162, 163).

La repetitividad se determinó mediante la realización del ensayo genotípico in-house a tres réplicas de cinco muestras, por un solo técnico en una sola corrida. La reproducibilidad se determinó mediante la realización del ensayo genotípico in-house a tres réplicas de otras

cinco muestras. Una réplica de cada muestra se analizó por un técnico en una corrida y las otras dos se analizaron en otra corrida por un segundo técnico (el autor del presente estudio).

El grado de identidad de la secuencia nucleotídica se definió como el porcentaje de identidad nucleotídica resultante de la comparación en pares de las secuencias nucleotídicas y se determinó utilizando la herramienta de alineamiento en pares EMBOSS (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_ needle/nucleotide.html). Las posiciones de la secuencia en las que se observaron mezclas de nucleótidos se consideraron discordantes respecto a las no mostraban mezclas.

El grado de identidad aminoacídica se definió como el porcentaje de identidad aminoacídica de una comparación en pares de la secuencia de aminoácidos. El mismo se determinó en las posiciones asociadas a mutaciones de resistencia a los ARVs y en las posiciones asociadas a mutaciones de vigilancia de la resistencia a los ARVs. Los cálculos se realizaron utilizando SeqScape version 2.6. Las mezclas de aminoácidos se consideraron discordancias.

#### III.3.3.4 Evaluación de la aplicación del ensayo in-house en muestras clínicas.

Se determinó la proporción de muestras clínicas que se amplificaron con éxito y de ellas las que pudieron ser secuenciadas utilizando el ensayo in-house. Se calculó el porcentaje de las muestras de cada subtipo que pudieron ser secuenciadas y el número de nucleótidos de las mismas.

### III.4. Evaluación de la resistencia del VIH-1 a los ARVs en Cuba después de la implementación de los ensayos genotípicos de resistencia a los antirretrovirales.

#### III.4.1. Muestras clínicas.

Se utilizaron muestras de todos los pacientes a quienes se les indicó una prueba de resistencia a los ARVs, como parte de su atención clínica. Se analizaron muestras de pacientes con fallo a la TARVAE y de individuos no tratados. En este estudio sólo se analizó una muestra por cada paciente y abarcó todos los pacientes a quienes se le indicó estudio de resistencia a los ARVs en el intervalo de tiempo que se mencionó anteriormente.

### III.4.2. Ensayo genotípico in-house de resistencia.

Para la determinación del genotipo del VIH-1 presente en las muestras y la evaluación de la resistencia a los ARVs se llevó a cabo el mismo procedimiento evaluado en este trabajo, Acápite III.1.

### III.4.3. Análisis de los resultados.

#### III.4.3.1 Subtipo

El subtipo del VIH se determinó utilizando la herramienta Rega version 3 (http://regatools.med.kuleuven.be/typing/v3/hiv/typingtool/) y se confirmó por análisis filogenético manual, utilizando el programa CLUSTAL-X y el método de unión por vecindad en la plataforma MEGA version 6 (corrección de dos parámetros de Kimura, bootstrap 1000) (164). La asignación de las formas genéticas recombinantes se realizó utilizando Simplot version 3.5.1. (155).

#### III.4.3.2 Resistencia en no tratados

La resistencia del VIH-1 a los ARV en las muestras de los pacientes no tratados se analizó mediante la herramienta Calibrated Population Resistance (CPR) tool version 6.0 (http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi) y se basó en la lista de las mutaciones para la vigilancia de la resistencia a los medicamentos del 2009 elaborada por Bennett y cols. (156).

#### III.4.3.3 Resistencia en Tratados

La interpretación de la resistencia del VIH-1 a los ARVs se llevó a cabo mediante el algoritmo Rega version 9.1.0 (http://rega.kuleuven.be/cev/avd/software/rega-algorithm). El nivel de resistencia a las clases de ARVs se calculó promediando el porcentaje de resistencia alta (R) y de resistencia intermedia (I) asignado por el algoritmo a un medicamento en particular. La resistencia completa a una clase de ARVs (RCC) se definió como la ausencia de susceptibilidad (con RA o RI) a todos los medicamentos de una misma familia de ARVs (ITIAN, ITINAN, IP) (165). La resistencia a múltiples ARVs (RMA) se definió como la resistencia (incluida RA o RI) a todos los ARVs de las 3 clases principales utilizadas (ITIAN, ITINAN, IP), donde puede existir como máximo 1 droga susceptible entre las 3 clases (165).

## III.5. Consideraciones Éticas.

El presente trabajo formó parte de un Proyecto de Investigación Internacional aprobado por el Comité de Ética del IPK (Anexo 1). Se desarrolló conforme a las leyes y reglamentos

vigentes establecidos por el MINSAP y el CITMA. Cumple con los principios para las investigaciones médicas en seres humanos (OMS, 2008), enunciados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

El médico que atendió a todos los individuos que se incluyeron en el estudio, les explicó el contenido del consentimiento informado, con un lenguaje claro y sencillo para facilitar su comprensión, haciendo hincapié en la voluntariedad. Tras conocer de su asentimiento en participar, solicitó el consentimiento por escrito, de cada persona después de asegurar la comprensión de la información (Anexo 2). En todo momento se mantuvo la confidencialidad con respecto a la identidad de los individuos y con el manejo de la información epidemiológica contenida en la base de datos que se elaboró posteriormente.

### III.6. Análisis estadístico de los resultados

Se elaboró una base de datos que incluyó la información de interés para la presente investigación, la cual se obtuvo de la Historia Clínica de los pacientes y de la Base de Datos SIDATRAT (166), disponible en el IPK. Después de obtener el consentimiento informado de cada paciente, se confeccionó un modelo de recolección de información (Anexo 3) con todos los antecedentes clínicos, virológicos, epidemiológicos y demográficos de cada paciente, que eran relevantes para el estudio.

Se utilizó la prueba exacta de Fisher para comparar las frecuencias de cada subtipo de VIH-1 que se observaron en pacientes tratados y en no tratados. Además, se utilizó para comparar la frecuencia de las mutaciones de resistencia transmitida en pacientes con infección crónica respecto a los pacientes con diagnóstico reciente. También se utilizó para comparar la frecuencia de mutaciones de resistencia adquirida entre los pacientes expuestos a uno, dos y tres o más regímenes de TARVAE; así como para comparar los niveles de resistencia durante los años que se realizó la investigación.

La prueba de Chi cuadrado con y sin corrección de Yates se utilizó para comparar la frecuencia que se observó de cada mutación de resistencia entre los diferentes subtipos según la TARVAE que recibían los pacientes al momento de solicitar la prueba de resistencia. Tanto para realizar la prueba exacta de Fisher como para la prueba de Chi cuadrado se utilizó el programa Epidat versión 3.0.10 (167). La operacionalización de las variables que se estudiaron se representa en el anexo 5. Se consideraron significativos los valores de $OR>1$ y $p<0,05$, con un nivel de significación para el intervalo de confianza (IC) del 95 %.

# IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

# IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

## IV.1. Estandarización de un ensayo in-house para la determinación del genotipo de VIH-1 y la evaluación de la resistencia a los antirretrovirales en Cuba.

### IV.1.1. Determinación del límite inferior de amplificación.

El LIA del ensayo genotípico in-house estuvo en el rango de 84 a 529 copias de ARN/mL y la mediana fue de 275 copias de ARN/mL (RIC: 225-363) (Tabla 3). Para el subtipo A (A1) fue de 84 copias/mL, para el subtipo B 300 copias/mL, para el subtipo C 200 copias/mL, para la FRC18_cpx 100 copias/mL, para la FRC19_cpx 250 copias/mL y para las FRC(20,23,24)_BG 260 copias/mL.

Tabla 3. Límite inferior de amplificación del ensayo genotípico in-house para la determinación del genotipo de VIH-1.

| Muestra | Subtipo | Carga viral original copias de ARN/mL | LIA copias de ARN /mL |
|---|---|---|---|
| **1** | **A1** | 33 333 | 84 |
| **2** | | 70 000 | 350 |
| **3** | **B** | 52 873 | 529 |
| **4** | | 12 000 | 300 |
| **5** | | 3 009 000 | 301 |
| **6** | | 1 000 000 | 500 |
| **7** | **C** | 15 000 | 375 |
| **8** | | 15 000 | 375 |
| **9** | | 50 574 | 253 |
| **10** | | 200 000 | 200 |
| **11** | **FRC18_cpx** | 11 000 | 138 |
| **12** | | 16 000 | 160 |
| **13** | | 465 507 | 466 |
| **14** | | 80 000 | 100 |
| **15** | **FRC19_cpx** | 1 100 000 | 275 |
| **16** | | 11 000 | 275 |
| **17** | | 2 000 | 250 |
| **18** | | 499 989 | 250 |
| **19** | **FRC(20,23,24)_BG** | 114 940 | 287 |
| **20** | | 26 000 | 260 |

ARN: Ácido Ribonucleico, LIA: Límite Inferior de Amplificación FRC: Forma Recombinante Circulante, cpx: compleja (por sus siglas en inglés).

Utilizando el ensayo genotípico in-house se amplificaron muestras con niveles de viremia bajos (NVB), que se definen como mediciones de CV en plasma que van desde 50 hasta 999 copias de ARN/mL (168). Los resultados sugieren que el LIA del ensayo genotípico in-house es inferior al umbral de 1 000 copias de ARN/mL recomendado por la OMS (160).

Es muy importante determinar el LIA del ensayo genotípico in-house, porque permite conocer su capacidad para amplificar muestras con NVB. En los pacientes con TARVAE es frecuente encontrar periodos en los que se observan NVB. Sin embargo, son pocos los ensayos genotípicos que logran amplificar muestras de pacientes con viremia inferior a las 1 000 copias de ARN/mL (168).

Varios ensayos genotípicos in-house desarrollados en los últimos años lograron un LIA menor que 1 000 copias de ARN/mL. Aitken y cols. en el año 2012 diseñaron un ensayo capaz de amplificar muestras de varios subtipos del grupo M (A-H y FRC_01AE) del VIH-1 con NVB. El ensayo alcanzó el LIA de 1 000 copias de ARN/mL, incluso logró resultados confiables en las diluciones con carga viral estimada de 500 copias de ARN/mL (169). Chew K. K. y cols. durante la evaluación de un ensayo genotípico para determinar la resistencia del VIH a los ARVs en muestras clínicas lograron la determinación del genotipo de todas las muestras con carga viral mayor que 500 copias de ARN/mL (170). Gonzalez-Serna y cols. en el año 2014 estudiaron el rendimiento de dos ensayos genotípicos en condiciones de NVB y determinaron exitosamente el genotipo de las muestras con carga viral cercana a las 1 000 copias de ARN/mL en el 90% de las muestras con más de 250 copias/mL y en el 74% de las muestras con carga viral inferior a ese valor. En este estudio los resultados fueron similares sin importar el subtipo viral (168).

Otros ensayos no lograron amplificar exitosamente las muestras con NVB. Chaturbhuj y cols. en el año 2013 solo lograron analizar la mitad de las muestras con NVB (171). Inzaule y cols. en el año 2013 amplificaron una muestra de 11 (9,1%) que tenían carga viral inferior a las 1 000 copias/mL durante la evaluación de un ensayo genotípico in-house aplicado principalmente a muestras de los subtipos A, D, G, FRC10_CD y recombinantes de A/D (172).

### IV.1.2. Fidelidad.

El control negativo resultó ser negativo mediante el ensayo genotípico in-house. Para los especímenes 3 y 14 (Tabla 4), las secuencias nucleotídicas que se generaron utilizando el ensayo ViroSeq fueron más cortas que lo necesario (1 218 y 1 221 nucleótidos respectivamente), por lo tanto, solo se evaluaron 88 de las 89 mutaciones de resistencia a los ARVs (MRA) para esas dos muestras.

La mediana del grado de identidad nucleotídica entre las secuencias que se obtuvieron por ambos ensayos fue de 98,7 % (fidelidad). En cada caso el grado de identidad nucleotídica estuvo por encima del criterio de aceptación que se definió *a priori* ≥95%. Se observaron 235 diferencias nucleotídicas al comparar los resultados de las 14 muestras utilizando los dos ensayos, el 98 % (230/235) de las diferencias se debieron a la detección de mezclas de nucleótidos en una misma posición. Las otras diferencias (5/235) fueron el resultado de la detección de nucleótidos diferentes en la lectura realizada por ambos ensayos. En total, se identificaron 486 mezclas de nucleótidos mediante el ensayo ViroSeq y/o el ensayo genotípico in-house. De ellas, el 53% (256/486) se detectaron en ambos ensayos, mientras que el 31% (150/486) se detectaron por el ensayo ViroSeq y el 16% (80/486) por el ensayo genotípico in-house.

El grado de identidad aminoacídica en las posiciones asociadas a las MRA fue de 99,0% (fidelidad), 1 231 de las 1 244 posiciones eran idénticas por ambos métodos (Tabla 5). Se observó una concordancia de un 99,5% (1 210 de 1 216 posiciones) si no había mezclas de aminoácidos presentes en el resultado de ViroSeq y de un 75% (21 de 28 posiciones) cuando sí habían mezclas de aminoácidos.

El grado de identidad aminoacídica en las posiciones asociadas a MVRA fue de un 99,7% (590 de 592 posiciones) si no había mezclas de aminoácidos presentes en el resultado de ViroSeq y de un 90,0% (9 de 10 posiciones) cuando sí habían mezclas de aminoácidos. De manera general, 590 de las 602 posiciones evaluadas eran concordantes entre los dos ensayos, resultando en una fidelidad de 99,5%.

Se alcanzó el criterio de aceptación predefinido para la fidelidad, tanto en las posiciones de MRA como en las de MVRA. Todas las diferencias aminoacídicas se debieron a las mezclas de nucleótidos detectadas por un método y/o por el otro. Se identificaron 33 mezclas de aminoácidos en las posiciones de MRA y 12 en las de MVRA, empleando el ensayo genotípico in-house y/o el ensayo ViroSeq. De estas mezclas de nucleótidos el 61%, (20/33) se detectaron por ambos ensayos en posiciones de MRA y el 75% (9/12) en las de MVRA. Utilizando el ensayo ViroSeq se detectaron mezclas en el 21% (7/33) de las posiciones de MRA y en el 8% (1/12) de las MVRA, mientras que con el ensayo genotípico in-house se observaron mezclas en el 18% (6/33) y en el 17% (2/12), respectivamente. El ensayo genotípico in-house detectó mezclas en el 46% (6/13) de las posiciones discordantes

asociadas a MRA y en el 67% (2/3) de las posiciones de MVRA discordantes, mientras que ViroSeq detectó las mezclas en siete y en una posición, respectivamente.

La especificidad y la sensibilidad del ensayo genotípico in-house para la detección de las MRA fueron 99,5% y 94,1%, respectivamente, mientras que, para la detección de las MVRA fueron 99,7% y 95,5% respectivamente (Tabla 5). Solo tres MRA (K45R en la PR; D67N y H221Y en la TI) se detectaron con el ensayo ViroSeq y no con el ensayo genotípico in-house. Las otras diferencias que se observaron se relacionaban con cambios aminoacídicos que no están incluidos en las reglas de los algoritmos de interpretación de la resistencia a los ARVs. Al no detectarse la mutación H221Y en la TI utilizando el ensayo genotípico in-house, se dejó de identificar la resistencia a la rilpivirina (RPV) según los algoritmos de Rega y el ANRS. La no detección de la mutación D67N en la TI hizo que no se encontrara resistencia a AZT y a la d4T de acuerdo al algoritmo de HIVDB. La diferencia en la detección de la mutación K45R en la PR no influyó en la interpretación de la resistencia.

Mediante el ensayo genotípico in-house se detectaron dos MRA (H69N y V77I en la PR) que no se encontraron con el ensayo ViroSeq. Solo la H69N alteró el resultado de la interpretación de la resistencia para Tipranavir/r (TPV/r) según el algoritmo de ANRS (resistencia según el ensayo genotípico in-house y resistencia intermedia según el ensayo ViroSeq). Se detectó una MVRA (D67N en la TI) por el ensayo ViroSeq y no por el ensayo genotípico in-house, teniendo las implicaciones para la interpretación de la resistencia explicadas en el párrafo anterior.

**Tabla 4. Evaluación de la fidelidad en cada muestra para el ensayo genotípico in-house comparado con el ensayo ViroSeq.**

| Muestra | Subtipo | Carga Viral (copias/mL) | Ensayo | Mutaciones de vigilancia de la resistencia a los ARVs (MVRA). | | Identidad de secuencia (%) | | Identidad de secuencia AA (%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | PR | TI | NT | AA | MRA | MVRA |
| 1 | A/G | 2 455 | VS | K20I,E35D,M36I,R41K,H69K K70R,V77I,V82I,L89M | | 98,0 | 97,9 | 97,8 | 100,0 |
| | | | EGIH | K20I,E35D,M36I,R41K,H69K V77I,V82I,L89M | | | | | |
| 2 | H | 28 184 | VS | G16E,K20R,M36I,R41K,K43R D60E,L63N,H69K,L89I | | 96,7 | 97,2 | 98,9 | 100,0 |
| | | | EGIH | G16E,K20R,M36I,R41K,D60E L63N,H69K,L89I | | | | | |
| 3 | D/B | 2 884 | VS | G16A,R41N,H69Q,V77I | E40D,V189I | 98,9 | 99,1 | 100,0 | 100,0 |
| | | | EGIH | G16A,R41N,H69Q,V77I | E40D,V189I | | | | |
| 4 | B | 5 129 | VS | E35D,L63P,I93L | | 98,7 | 99,3 | 100,0 | 100,0 |
| | | | EGIH | E35D,L63P,I93L | | | | | |
| 5 | D | 158 489 | VS | L10V,G16E,R41K,D60E,L64I V77I,I85V,L89F,I93L | | 96,9 | 97,0 | 97,8 | 100,0 |
| | | | EGIH | L10V,G16E,R41K,K43E,D60E I64L,V77I,I85V,L89F,I93L | | | | | |
| 6 | B | 166 | VS | L10I,E35D,M36I,R41K,I54V V62I,L63T,A71V,I84V,L90M | L74V,A98S,Y115F M184V,H221Y | 98,6 | 98,4 | 96,6 | 100,0 |
| | | | EGIH | L10I,E35D,M36I,I54V,V62I L63T,A71V,I84V,L90M | L74V,A98S,Y115F M184V,H221Y | | | | |
| 7 | G | 42 658 | VS | K20I,E35Q,M36I,R41K,L63P H69K,V82I,L89M | | 99,2 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| | | | EGIH | K20I,E35Q,M36I,R41K,L63P H69K,V82I,L89M | | | | | |
| 8 | | 0 | VS | | | | | | |
| | | | EGIH | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **9** | B | **8 318** | VS | **I15V,E35D,L63P** | | **99,9** | **99,8** | **100,0** | **100,0** |
| | | | **EGIH** | I15V,E35D,L63P | | | | | |
| **10** | **C** | **10 965** | **VS** | I15V,M36I,R41N,L63P,H69K L89M,I93L | E40D | 98,8 | 99,1 | 100,0 | 100,0 |
| | | | **EGIH** | I15V,M36I,R41N,L63P,H69K L89M,I93L | E40D | | | | |
| **11** | **B/D** | **236 027** | **VS** | I15V,K20R,E35D,M36I,R41K,I50I I54V,I62V,L63P,A71V,N88D | L210W,T215S | 98,6 | 97,9 | 96,6 95,3 | |
| | | | **EGIH** | I15V,K20R,E35D,M36I,R41K I47M,I50M,I54V,I62V,L63P,H69N A71V,N88D | L210W,T215S | | | | |
| **12** | **FRC02_AG** | **1 413** | **VS** | K20I,M36I,R41K,H69K,K70R,L89M | D67N,V106A | 99,4 | 98,8 | 98,9 | 97,7 |
| | | | **EGIH** | K20IM36I,R41K,H69K,K70R,L89M | V106A | | | | |
| **13** | **A** | **692** | **VS** | E35D,M36I,R41K,H69K,K70R L89M | E40D,K103N V179I | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| | | | **EGIH** | E35D,M36I,R41K,H69K,K70R L89M | E40D,K103N V179I | | | | |
| **14** | **A** | **18 621** | **VS** | K20KR,L33F,M36I,R41K,H69K L89M,I93L | D67N,T69N V179I,219Q | 98,9 | 99,3 | 98,9 | 100,0 |
| | | | **EGIH** | K20R,L33F,M36I,R41K,H69K L89M,I93L | D67N,T69N V179I,K219Q | | | | |
| **15** | **B** | **66 069** | **VS** | K20R,M36ILM,45KR,V62I,L63AP V77I,I93L | M41L | 99,3 | 99,5 | 100,0 | 100,0 |
| | | | **EGIH** | K20R,M36ILM,K45KR,V62I L63AP,V77I,I93L | M41L | | | | |

EGIH: Ensayo Genotípico In-House, VS: ViroSeq, PR: Proteasa, TI: Transcriptasa Inversa, NT: Nucleotídica, AA: Aminoacídica, MRA: Mutaciones de Resistencia a los ARVs, MVRA: Mutaciones de Vigilancia de la Resistencia a los ARVs.

Tabla 5. Evaluación general de la sensibilidad, la especificidad y la fidelidad en la detección de las mutaciones de resistencia a los ARVs y de las mutaciones de vigilancia de la resistencia a los ARVs mediante el ensayo genotípico in-house de determinación del genotipo de VIH-1.

| Ensayo genotípico in-house | Sensibilidad | Especificidad | Fidelidad |
|---|---|---|---|
| **Posiciones de MRA** | 94,1 % | 99,5 % | 99,0 % |
| **Posiciones de MVRA** | 95,5 % | 99,7 % | 99,5 % |

MRA: Mutaciones de Resistencia a los ARVs, MVRA: Mutaciones de Vigilancia de la Resistencia a los ARVs.

Las guías de la OMS (173) recomiendan el uso del ensayo comercial ViroSeq Genotyping System como un estándar de referencia y su empleo con este objetivo ha sido descrito frecuentemente en varios estudios (162, 170, 172, 174-181). El ViroSeq solo ha sido aprobado por la FDA para la determinación del genotipo y de las mutaciones de resistencia de muestras de VIH-1 del subtipo B. Algunas estudios encontraron dificultades empleando este ensayo con subtipos no B (182-184), mientras que otros informaron que es aplicable a varios subtipos no B y a formas recombinantes (172, 185-188).

Beddows y cols. evaluaron la resolución del ensayo ViroSeq para la detección de la resistencia a los ARVs en muestras de VIH-1 de los subtipos del grupo M y generaron secuencias consenso en el 83,8% de las secuencias analizadas. De manera general, secuenciaron las muestras del subtipo B con un mayor éxito que los del resto de los subtipos del grupo M, por lo cual propusieron que es necesario mejorar la resolución de este ensayo para los subtipos no-B (183).

En el año 2011, Aghokeng y cols. informaron una frecuencia elevada de fracasos del ensayo ViroSeq para la determinación de la resistencia del VIH-1 a los ARVs en Cameroon. Utilizaron muestras de los cuatro grupos del VIH y señalaron que la resolución del ensayo comercial ViroSeq puede afectarse por la diversidad genética elevada de los subtipos no-B que predominan en ese país (182).

Thiam y cols. analizaron la resolución del ensayo ViroSeq para la determinación de la resistencia genotípica de las variantes genéticas del VIH-1 que circulan en Senegal. Aplicaron este ensayo a un grupo de muestras donde estaban presentes 11 subtipos o FRC y 16 FRUs, con predominio de la FRC02_AG. Los resultados mostraron que los cebadores empleados en el ensayo ViroSeq podían tener una tasa de fracaso que iba desde el 1,4% hasta el 71,4% dependiendo de subtipo viral (184).

Chen y cols. emplearon exitosamente el ensayo ViroSeq como estándar de referencia para la evaluación de un ensayo genotípico in-house de resistencia que se aplicó a muestras de los subtipos: A1, B, C, D, G, FRC01_AE, FRC02_AG, FRC06_cpx, FRC07_BC, FRC08_BC, FRC15_01B y otras FRUs (181). Saravanan y cols. en el año 2009 realizaron la evaluación de un ensayo genotípico in-house, lo compararon con el ensayo ViroSeq en 50 muestras de subtipos diferentes del VIH-1 y lograron determinar el genotipo de todos los casos con los dos métodos (179). Wallis y cols. utilizaron el ensayo ViroSeq como estándar de referencia para la evaluación de un ensayo genotípico in-house asequible en muestras de varios subtipos no-B obteniendo resultados satisfactorios (180). En el año 2013 Inzaule y cols. lograron amplificar muestras de los subtipos A, D, G, FRC10_CD y recombinantes de A/D empleando el ensayo ViroSeq en el Instituto de Investigaciones Médicas de Kenya (172).

El ensayo genotípico in-house que evaluamos en esta investigación mostró una buena concordancia a nivel nucleotídico (98,7%) con el ensayo ViroSeq. Las diferencias que se encontraron se debieron fundamentalmente a la presencia de más de un nucleótido en la misma posición. El ensayo ViroSeq detectó más mezclas de nucleótidos que el ensayo in-house, lo que indicó una sensibilidad mayor del ensayo ViroSeq en la detección de mezclas de nucleótidos. Se observaron pequeñas diferencias aminoacídicas entre los dos métodos tanto en las posiciones asociadas a MVRA (3 de 602 o 0,5%) como de MRA (13 de 1 244, 1,0%) y todas se debían a mezclas de nucleótidos. El número de mezclas de nucleótidos detectadas por el ensayo in-house fue similar al número de mezclas detectadas por el ensayo ViroSeq (6/13 en posiciones de MRA, 2/3 en posiciones de MVRA y 7/13 en posiciones de MRA, 1/3 en posiciones de MVRA, respectivamente).

Otros ensayos genotípicos in-house observaron menos mezclas de nucleótidos que el ensayo ViroSeq. Chew K. K. y cols. identificaron casi tres veces más mezclas de nucleótidos en las mismas muestras al analizarlas con el ensayo ViroSeq. En este caso es importante destacar que eran muestras con una variabilidad genética elevada (170). Fokam y cols. también detectaron un número mayor de mezclas con el ensayo ViroSeq que con el ensayo in-house en evaluación, en un grupo de muestras en las que no estaba presente el subtipo B (177).

En el presente trabajo, los patrones de resistencia para los inhibidores de la TI cambiaron ligeramente solo en dos de las 14 muestras analizadas, debido a dos MRA (D67N y H221Y) que se detectaron por el ensayo ViroSeq pero no por el ensayo in-house. Para estas muestras, la carga viral estaba cerca del límite recomendado para la amplificación (1 413 y 1 660 copias de ARN/mL) consistente en 1,000 copias de ARN/mL. La revisión de los electroferogramas reveló que ambas discordancias pudieran atribuirse a diferencias en las estrategias de la edición de las secuencias. Esto se reportó en otros ensayos en los que las diferencias se debieron a que las mutaciones se representaron como un pico secundario muy pequeño (<10%). Huang y cols. evaluaron la variabilidad inter-laboratorio en el proceso de edición de los electroferogramas de la secuenciación y su influencia en la detección de las mutaciones de resistencia. Los autores informaron un 12% de discordancia en la detección de las MRA, todas se debieron a diferencias en las estrategias de edición de las secuencias que utilizaban los diferentes laboratorios. Esto refleja la necesidad de la elaboración de guías estandarizadas de edición de las secuencias en los ensayos genotípicos. Se propone que estas guías deben incluirse en los programas de entrenamiento y en los programas de control de calidad para la determinación del genotipo del VIH (189). Posteriormente, Woods y cols. en el año 2012, desarrollaron y validaron una herramienta bioinformática llamada ReCall, que permite la edición completamente automática de los archivos de secuencia obtenidos en los ensayos genotípicos de resistencia a los ARVs. Esta herramienta sustituyó la edición e interpretación manual y subjetiva de las secuencias, que resultaba ser un proceso lento y trabajoso, sin comprometer la exactitud de la edición por lo que puede incluirse en la evaluación de la calidad (190).

En el presente estudio, las discordancias entre los patrones de resistencia de ViroSeq y del ensayo in-house fueron mínimas, demostrando la capacidad del ensayo in-house de detectar correctamente las MRA con relevancia clínica. Como resultado, podemos decir que la resolución del ensayo in-house fue buena en comparación con el estándar de referencia ViroSeq.

### IV.1.3. Precisión.

El ensayo genotípico in-house mostró buenos resultados, tanto para la repetitividad (Tabla 6) como para la reproducibilidad (Tabla 7). En la evaluación de la reproducibilidad solo se

pudieron generar dos réplicas de la muestra 21 y la amplificación de la muestra 25 fue negativa tres veces en la dilución de 250 copias/mL.

La identidad de la secuencia nucleotídica en la evaluación de la repetitividad estuvo en el rango de 98,8% a 99,9% y para la reproducibilidad entre 98,7% y 99,7%. Para ambos análisis, el 100% de las comparaciones en pares (15/15 y 20/20) fueron idénticas en más de un 98% a nivel nucleotídico. Este valor es superior al umbral de identidad a nivel nucleotídico predefinido (≥ 98% en un 90% o más de las comparaciones en pares). A nivel aminoacídico, se alcanzó un alto grado de identidad de la secuencia en todas las posiciones, tanto en las posiciones de MRA como en las de MVRA, como se muestra en las Tablas 6 y 7. No se observaron diferencias en la detección de las mutaciones en las posiciones de MVRA entre todas las réplicas de cada muestra, tanto para la repetitividad como para la reproducibilidad.

En dos muestras no se detectaron todas las MRA durante la evaluación de la repetitividad, esto tuvo una influencia menor en la interpretación de la resistencia. Los cambios aminoacídicos particulares que se encontraron no estaban incluidos en las reglas de la interpretación de la resistencia los medicamentos o no produjeron cambios en la interpretación de los resultados.

En total, solo dos MRA no se detectaron en las tres réplicas. En la muestra 17, la MRA L10F no se detectó en dos réplicas, lo que resultó en una interpretación alterada de la resistencia al atazanavir/r (ATV/r) según los algoritmos de las bases de datos REGA y ANRS (de resistente en los resultados de ViroSeq a resistencia intermedia y susceptible, respectivamente, en los resultados del ensayo in-house). Además, resultó en una interpretación alterada de la resistencia al fosamprenavir/r (FPV/r) (de resistente a susceptible) y al SQV/r (de resistente a intermedia) según el algoritmo de la base de datos ANRS. En la muestra 20, la mutación A71V no se detectó en dos réplicas, alterando la interpretación de la resistencia de la base de datos REGA para el SQV/r (de resistencia intermedia a susceptible).

En la evaluación de la reproducibilidad, solo dos MRA no se detectaron en tres réplicas. En la muestra 23, la mutación V189I no se detectó en la réplica generada por el segundo técnico. En la muestra 25-2 000, la mutación M36V solo se detectó en una de las réplicas.

Sin embargo, la ausencia de las mutaciones V189I y de la M36V no cambió la interpretación de la resistencia a IP de estas muestras.

Finalmente, las secuencias generadas de las diluciones 25–2 000, 25–1 000 y 25–500 se compararon con la secuencia obtenida de la muestra de plasma original no diluida, las medianas respectivas del grado de identidad nucleotídica fueron 98,9% ± 0,6, 99,1% ± 0,2 y 99,0% ± 0,3. Las medianas del grado de identidad aminoacídica en todas las posiciones fueron: 99,4% ± 0,5, 99,5% ± 0,0 y 99,8% ± 0,3, respectivamente. En las posiciones de MRA fueron: 99,3% ± 1,3, 99,3 ± 1,3 y 100% ± 0,0, respectivamente. En las posiciones de MVRA fueron: 100,0% ± 0,0, 100% ± 0,0 y 100,0% ± 0,0, respectivmente. Las interpretaciones de resistencia a los medicamentos fueron concordantes entre todas las réplicas y la muestra de plasma no diluida.

Tabla 6. Repetitividad del ensayo genotípico in-house en la determinación del genotipo de VIH-1.

| Muestra | Subtipo | Mutaciones en las posiciones de MRA | | Identidad de secuencia (% ± DE) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PR | TI | NT | AA | MRA | MVRA |
| **16** | **FRC18_cpx** | G16Q, K20I, E35G, M36I, R41K, M46I, H69K, K70R, A71T, V77IV, V82I, L89V, L90M | M41L, T69D, K103N, Y181F, M184V, L210W, T215Y, K219R, H221Y | 99,9±0,1 | 99,9±0,1 | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 |
| **17** | **C** | L10F, K20I, E35EG, M36I, R41K, M46I, I62IV, L63P, L64IV, H69K, A71ITV, T74P, L89M, L90M, I93L | D67N, K70R, A98G, K101E, M184V, G190A, T215F, K219Q | 99,9±0,1 | 99,9±0,1 | 99,3±0,6 | 100,0±0,0 |
| **18** | **B** | K20R, M36I, R41K, K45R, I62V, L63P, H69Q | - | 99,9±0,1 | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 |
| **19** | **FRC20_BG** | K20I, M36I, R41K, L63S, H69K, K70R, V82I, L89M | M41L, D67N, K70R, V106A, M184V, L210W, T215F, K219E, F227L | 99,8±0,1 | 99,9±0,1 | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 |
| **20** | **FRC19_cpx** | D30N, E35D, M36I, R41K, K43R, K45Q, L63HP, L64IV, H69Q, A71V, N88D, I93L | L74V, K103N, M184V, T215Y,Y318F | 98,8±0,2 | 98,2±0,5 | 95,5±1,1 | 98,5±1,3 |

PR: Proteasa, TI: Transcriptasa Inversa, NT: Nucleotídica, AA: Aminoacídica, MRA: Mutaciones de Resistencia a los ARVs, MVRA: Mutaciones de Vigilancia de la Resistencia a los ARVs, DE: Desviación Estándar. FRC: Forma Recombinante Circulante.

Tabla 7. Reproducibilidad del ensayo genotípico in-house en la determinación del genotipo de VIH-1.

| Muestra | Subtipo | PR | TI | Identidad de secuencia (% ± DE) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | NT | AA | MRA | MVRA |
| **21** | C | 15V, E35D, M36I, R41K, H69K, 88NT, 89M | M41L, V75I, A98S, K103N, 132L, M184V, T215Y | 99,6 | 99,5 | 100,0 | 100,0 |
| **22** | FRC24_BG | 10I, 15V, K20I, E35D, M36I, R41K, 54V, 62V, 66F, H69K, K70R, 74K, V82I, 89M, 93IV | A62V, K70E, V75I, A98S, Y115F, Y181C, M184V | 99,7±0,1 | 99,5±0,3 | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 |
| **23** | FRC18_cpx | 16E, K20I, E35D, M36I, R41K, 64M, H69K, K70R, 89M | E40D, Y181C, M184V, 189IV, H221Y | 99,6±0,1 | 99,7±0,2 | 99,3±0,6 | 100,0±0,0 |
| **24** | B | 10I, K20IT, 33I, E35D, M36I, R41KR, 43T, 54V, 60EQ, 62V, 63P, 64IL, 66F, 71V, 73A, V82AT, 84V, 89V, 90M | M41L, D67N, T69D, K70R, L74I, V118I, V179I, M184V, Y188L,G190A, T215F,K219Q | 99,7±0,1 | 99,9±0,1 | 99,3±0,6 | 100,0±0,0 |
| **25–2 000** | FRC24_BG | K20I, E35D, M36IV, 38IL, R41K, H69K, V82I, 89M | A98S | 98,8±0,4 | 99,4±0,4 | 98,5±1,3 | 100,0±0 |
| **25–1 000** | FRC24_BG | K20I, E35D, M36I, R41K, H69K, K70KR, V82I, 89M | S68NS, A98S | 99,2±0,2 | 99,1±0,2 | 98,5±1,3 | 100,0±0 |
| **25–5 00** | FRC24_BG | K20I, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, 89M | A98S | 98,7±0,3 | 99,6±0,2 | 100,0±0 | 100,0±0 |

PR: Proteasa, TI: Transcriptasa Inversa, NT: Nucleotídica, AA: Aminoacídica, MRA: Mutaciones de Resistencia a los ARV, MVRA: Mutaciones de Vigilancia de la Resistencia a los ARVs. DE: Desviación Estándar. FRC: Forma Recombinante Circulante (por sus siglas en inglés).

Las diferencias observadas en los patrones de resistencia de las réplicas de una misma muestra fueron mínimas y la identidad de la secuencia nucleotídica fue elevada, incluso con cargas virales menores que 1 000 copias de ARN/mL. Los buenos resultados de la precisión del ensayo in-house diseñado en el presente estudio pueden explicarse por la adherencia estricta a las buenas prácticas de laboratorio. También pudieran ser un indicador de la robustez de este ensayo genotípico.

La OMS recomienda la validación de los ensayos genotípicos in-house, insistiendo en la evaluación de la precisión (162, 191). Los ensayos genotípicos desarrollados más recientemente predefinen los valores aceptables para estos parámetros. En este sentido establecen que deben ser iguales o superiores al 98% de identidad nucleotídica en el 90% o más de las comparaciones por pares realizadas. Sin embargo, no existe un consenso establecido de cómo evaluar la precisión para la determinación de las mutaciones relacionadas con la resistencia del VIH a los ARVs. En el presente estudio evaluamos la precisión como una medida de la repetitividad y la reproducibilidad, mientras que otros estudios evalúan la precisión determinando solamente uno de estos parámetros (162, 192).

Los resultados de este estudio son comparables con los obtenidos por Devidas y cols, durante la evaluación de un ensayo genotípico in-house asequible, con buena relación calidad costo. En dicho estudio la reproducibilidad y la precisión mostraron valores elevados de identidad de la secuencia nucleotídica, superiores al 99% en el 100% de las comparaciones, para ambos parámetros (162). Inzaule y cols. en el año 2013 determinaron la reproducibilidad y la precisión de un ensayo genotípico in-house, logrando de igual forma valores altos de 99,3% y 99,4 respectivamente (172). Acharya y cols. en el año 2014 obtuvieron valores elevados de identidad de la secuencia nucleotídica en la evaluación de la precisión y la reproducibilidad (99,68% y 99,76%, respectivamente) (193). Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los resultados de Zou y cols. en el año 2011. En su estudio obtuvieron resultados de precisión superiores al 98% en todas las réplicas (desde 98,22% hasta 99,65%), hay que señalar que en esa investigacción la precisión solo se analizó mediante la evaluación de la reproducibilidad (192).

### IV.1.4. Evaluación de la aplicación del ensayo in-house en muestras clínicas.

Inicialmente la amplificación fue exitosa en el 84% de las muestras (321/380). Se analizó nuevamente una segunda alícuota de ARN de cada muestra que no pudo amplificarse en el

primer intento y con esta estrategia pudieron amplificarse otras 19 muestras. Seguidamente se intentó una segunda ronda de extracción y amplificación para las 20 muestras que fallaron al procedimiento de amplificación y para las cuales aún había suficiente plasma disponible. Así pudieron amplificarse otras 5 muestras, lo que resultó en la amplificación del 91% de las muestras (345/380).

Se obtuvo la secuenciación de todas las reacciones amplificadas (345/345) y cubrieron 1302 nucleótidos. Sin embargo, tres secuencias no fueron útiles para su análisis, debido a que el control de calidad sugirió la edición por parte de la enzima humana APOBEC. Se logró, en total, la secuenciación del 99% de las muestras analizadas (342/345) y se obtuvieron secuencias que codificaban para los codones 1 - 99 de la PR y 1 - 335 de la TI, lo cual es mayor que la región mínima que debe secuenciarse de acuerdo a las guías de la OMS (173).

El análisis filogenético reveló que la distribución de los subtipos entre las 345 secuencias obtenidas fue: 34,9% de subtipo B, 12,8% de FRC19_cpx, 10,2% de FRC20_BG, 9,0% de FRC18_cpx, 9,0% de FRU, 7,8% de subtipo C, 7,0% de FRC24_BG, 3,2% de subtipo G, 3,2% de FRC23_BG, 0,9% de subtipo H, 0,6% de subtipo A, 0,6% de subtipo F, 0,6% de FRC02_AG, 0,3% de subtipo J y 0,3% de FRC31_BC. Estos resultados confirman que existe una diversidad genética elevada en Cuba y al mismo tiempo demuestran la robustez del ensayo genotípico in-house estandarizado en el presente estudio, que es capaz de detectar diferentes variantes virales en muestras clínicas, incluyendo las formas recombinantes.

Después del entrenamiento del personal, el ensayo genotípico in-house se implementó gradualmente en el año 2009, utilizando inicialmente muestras de años anteriores para corroborar el buen funcionamiento del ensayo. Más adelante, se introdujo el ensayo en la práctica clínica para el seguimiento de rutina de los pacientes que asistían al IPK y para los cuales era imprescindible la realización de los ensayos genotípicos de resistencia a los ARVs.

Anejo-Okopi y cols. en el año 2018 lograron amplificar y secuenciar el 95,2% de las muestras clínicas que analizaron, empleando un ensayo genotípico in-house costo-efectivo. Además, pudieron describir la frecuencia de las mutaciones de resistencia a los ARVs en los genotipos no-B del VIH-1 que circulan en Nigeria y constituyen las variantes genéticas

más frecuentes en ese país. Los autores señalan que este ensayo puede realizarse con un costo aproximado de 100 dólares, teniendo en cuenta el gasto en reactivos por muestra, valor muy similar al obtenido en la implementación del ensayo genotípico que se evaluó en el presente trabajo (194).

Chimukangara y cols. compararon un ensayo genotípico in-house y uno comercial en Zimbabwe e informaron que su ensayo amplificó el 93 % de las muestras, de ellas el 96,2% pudieron secuenciarse. Las muestras clínicas que no pudieron amplificarse en este estudio, tenían una carga viral cercana al LIA del método que se empleó por los investigadores (1000 copias/mL) (195).

Chaturbhuj y cols. en el año 2014 evaluaron un ensayo genotípico in-house que resultó costo-efectivo en la India, para la determinación de la resistencia del VIH-1 a los ARVs a partir de muestras de plasma. Además, el método que validaron fue capaz de completar exitosamente cinco paneles externos de calidad que le permitieron obtener la certificación del programa Virology Quality Assessment (VQA) of the National Institute of Health (NIH). Este ensayo determinó el genotipo de las muestras clínicas de todos los subtipos del grupo M con un costo similar al del ensayo genotípico in-house que se evaluó, logrando reducir los gastos en más del 50%, de 300 dólares americanos que cuesta desarrollar el ensayo genotípico comercial ViroSeq a 112 dólares. Este ensayo puede emplearse para el seguimiento clínico eficiente de los pacientes con fallo al TARVAE. También permite estudiar la emergencia y la transmisión de las variantes de VIH resistentes a los medicamentos en países con recursos limitados. La aplicación de los ensayos genotípicos in-house asequibles y validados permite la toma de decisión correcta para el manejo adecuado de los pacientes infectados por VIH-1, lo que reduce el riesgo de que se establezcan mutaciones relacionadas con la resistencia a los ARVs (162).

Otro estudio de implementación de un ensayo genotípico in-house asequible se desarrolló por Acharya y cols. en el año 2014. Ese ensayo se empleó para determinar el genotipo de un panel de 225 muestras, de las cuales 210 (93,3%) pudieron ser amplificadas y 206 (91,5) se secuenciaron y analizaron para la determinación del genotipo y los perfiles de resistencia. Este ensayo redujo el costo a 85 dólares que constituye el 28,0% del costo del ensayo genotípico comercial ViroSeq en el momento que se validó el método in-house. Sin embargo, a diferencia del ensayo que se evaluó en el presente trabajo, este ensayo se diseñó

y validó para determinar el genotipo de muestras de VIH predominantemente del subtipo C (85,5%) y subtipo A (14,0%) (193).

En el presente estudio se implementó y evaluó en Cuba un ensayo genotípico de resistencia in-house, su aplicación en muestras clínicas fue exitosa y mostró una sensibilidad muy buena para un rango amplio de subtipos de VIH-1. Todavía es necesario trabajar en su mejora, ya que el 16% de las muestras no pudieron ser amplificadas en un primer intento. Es posible que los valores bajos de carga viral influyeran negativamente en el éxito de la amplificación. Los ensayos de carga viral al momento de la realización de este estudio no se realizaban sistemáticamente a todos los pacientes en Cuba. En los casos en que se realizaban casi nunca se hacían en la misma fecha en que se tomaba la muestra para la determinación del genotipo, en esos casos la carga viral no estuvo disponible.

Los cebadores se diseñaron de manera tal que se unieran a varios subtipos de VIH-1. Las discordancias específicas de cada variante genética en los sitios de unión del cebador no pudieron investigarse en los casos en los que no se obtuvo amplificación. Esto se debió a que las muestras de estos pacientes no han sido probadas con metodologías alternativas y no existen hasta el momento secuencias disponibles de las mismas. Por tanto, la resolución de este ensayo debe verificarse en estudios futuros con un espectro amplio de muestras con carga viral conocida y los indicadores de calidad deben comprobarse regularmente.

### IV.1.5. Control de calidad.

El control negativo que se adicionó a cada corrida no mostró amplificación, lo que sugirió que no se produjo confusión de las muestras o contaminación cruzada. Además, ninguna de las secuencias que se generaron mostró una cantidad elevada de mezclas de nucleótidos. Se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando las secuencias que pasaron la evaluación del control de calidad. Las secuencias que se generaron de una misma muestra o del mismo paciente se agruparon juntas, con un soporte elevado de bootstrap, lo que indicó que no hubo confusión de las muestras o contaminación cruzada de las mismas (Anexo 4).

Una desventaja del ensayo genotípico in-house es que el riesgo de contaminación cruzada resulta mayor que con el ensayo ViroSeq. Esto se debe a que utiliza una RCP anidada y a que carece de un control de contaminación dUTP/UNG. Esto requiere la introducción de precauciones adicionales en la manipulación de las muestras y de los reactivos. Además

hace necesario la inclusión de un control negativo en cada ronda de amplificación para evitar la contaminación cruzada. El resultado negativo de los controles en cada ronda, la buena calidad de las secuencias, la especificidad alta del ensayo genotípico in-house y los resultados filogenéticos indicaron que no hubo contaminación cruzada en los procedimientos de laboratorio que se implementaron.

Chaturbhuj y cols. realizaron un estudio muy similar al presente en el cual evaluaron un ensayo in-house para determinar la resistencia del VIH-1 a los ARVs empleando el ensayo ViroSeq como gold standard. Ese estudio también presentó como desventaja principal la ausencia de un control de contaminación basado en dUTP/UNG. Sin embargo, señalaron que la contaminación de la RCP puede controlarse siguiendo las Guías de Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico (171).

La OMS recomienda el programa Sequence Quality Asessment Tool (SQUAT) para evaluar la calidad de las secuencias generadas, detectar los nucleótidos ambiguos, corrimientos del marco de lectura, inserciones y deleciones de las secuencias (196). Algunos estudios emplearon este programa (171, 172, 194, 197), pero existen otros elementos que permiten el control de la calidad de las secuencias generadas en el laboratorio. Según Clutter y cols. el análisis de los electroferogramas permite obtener información intrínseca del control de la calidad, incluyendo el nivel de inespecificidad dado por una intensidad baja de la señal y numerosos picos mal definidos (198). Además, la observación de un número elevado de mezclas electroforéticas de nucleótidos en una misma posición, mutaciones atípicas y mutaciones APOBEC pueden indicar problemas de calidad de la secuencia (199, 200).

Audu y cols. confirmaron la calidad de sus secuencias empleando la sección de "Quality Assurance Details" dentro del informe que brinda el programa HIVDB Calibrated Population Resistance Tool de la base de datos de Stanford (https://hivdb.stanford.edu/page/version-updates/) (201). Hauser y cols. indican que la obtención de dos electroferogramas, al menos, de cada sitio de resistencia contribuye a una mayor calidad del resultado. Además, indican que las ambigüedades en la secuencia nucleotídica consenso solo se deben considerar si el pico menor es, al menos, tres veces mayor que la señal de fondo y está presente, al menos, en dos electroferogramas (202).

Manasa y cols. recomiendan evaluar la calidad de cada secuencia utilizando la base de datos de Stanford (http://hivdb.stanford.edu). En ella se resume la calidad de la secuencia introducida resaltando las deleciones, inserciones, codones de parada, corrimientos del marco de lectura, posiciones ambiguas y residuos inusuales. Además, recomiendan hacer una base de datos con las secuencias generadas en el laboratorio en corridas anteriores y hacer un alineamiento de cada nueva secuencia contra dicha base. Si la nueva secuencia tiene una similitud superior al 97% con alguna de las de la base de datos entonces deben revisarse todos los pasos del procedimiento. Se debe comenzar por el análisis de las secuencias y regresar hasta la extracción de ARN para asegurarse de que no hubo confusión o contaminación entre las muestras (203).

## IV.2. Resistencia del VIH-1 a los ARVs en Cuba después de la implementación de los ensayos genotípicos de resistencia a los antirretrovirales.

### IV.2.1. Características generales de la población de estudio.

Este estudio abarcó un periodo de 5 años y 8 meses comprendido entre abril del año 2009 y diciembre del 2014. Se estudiaron un total de 926 muestras de plasma de pacientes infectados con VIH-1, el 63,1% (584/926) procedentes de pacientes tratados previamente y el 36,9% (342/926) de individuos no tratados. En ambos grupos, la mayoría de los pacientes eran varones (83,3%; 771/926) y el 76,8% (711/926) eran hombres que tienen sexo con hombres (HSH) (Tabla 8).

Estos resultados coinciden con lo que se reportó por diversos autores con relación al comportamiento nacional de la epidemia cubana de VIH-1, que se caracteriza por más de un 80% de hombres y un por ciento similar de HSH. Pérez y cols. en el año 2004 señalaron que hasta septiembre del 2003 el 79% de las infecciones por VIH-1 eran en hombres y la mayoría eran hombres que habían sido infectados al tener sexo con otros hombres (10).

Los resultados del presente estudio también son muy similares a los que informan Pérez y cols. en los años 2006 y 2007 en Cuba, donde el 82,8% de los pacientes eran del sexo masculino y el 73,9% eran HSH (15, 19). En el año 2011 Aragonés y cols. estudiaron la adherencia a la TARVAE en pacientes cubanos y observaron que un 77,6% (657/847) eran del sexo masculino (204). Machado y cols. al estudiar la resistencia transmitida y la diversidad genética del VIH-1 en Cuba en los años 2012 y 2013 encontraron que cerca del

85,0% eran del sexo masculino. Además, informaron que alrededor del 70% de los individuos eran HSH (205, 206).

Recientemente Kouri y cols. al estudiar el incremento de la proporción de los pacientes con progresión rápida a SIDA en Cuba, informaron que el 79,6% de los individuos incluidos en el estudio eran del sexo masculino (16).Esto también coincide con las características de la epidemia cubana de VIH publicadas por la Vicedirección de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública de Cuba al cierre del año 2019 (Dirección Nacional de Epidemiología M. Base de datos nacional de la infección por VIH. 2019).

La mediana de la edad en el presente estudio fue de 37,8 años (RIC: 30,0-45,0); siendo mayor en los pacientes tratados que en los no tratados (40,5 años (RIC: 33,6-46,6) y 32,4 años (RIC: 24,6-41,3), respectivamente). Las cargas virales fueron similares en los dos grupos de pacientes estudiados, no tratados y tratados (18 966 copias/mL (RIC: 3 794-84 768) y 21 264 copias/mL (RIC: 4 052-80 458), respectivamente). Es importante destacar que en ambos grupos y de manera general los valores fueron superiores a las 1 000 copias/mL (20 000 copias/mL (RIC: 3 966-80 458), Por otro lado, la mediana del recuento de los linfocitos T CD4+ estuvo por debajo de las 350 células/mm3 (241 células/mm3 (RIC: 138-382)), con valores más elevados en los individuos no tratados (349 células/mm3 (RIC: 201-479)) que en pacientes tratados (208 células/mm3 (RIC: 111-305)). (Tabla 8),

El seguimiento de la carga viral se realiza durante el estudio de la evolución de la infección por VIH en el paciente no tratado, pero su mayor valor radica en el monitoreo de la respuesta a la TARVAE o del fallo a la misma en los pacientes tratados (207). El objetivo inmediato de la TARVAE es reducir la replicación de VIH a un nivel por debajo del cual el virus no evolucione para que no emerjan mutantes resistentes (208). Este nivel exacto es desconocido, pero probablemente se encuentra en el rango entre 50 y 200 copias de ARN/mL. Por esta razón, el propósito de la TARVAE es reducir la carga viral a niveles no detectables en un periodo no mayor de 6 meses (207-210).

Se plantea que se puede observar viremia intermitente, con valores bajos de carga viral (50– 500 copias/mL), los cuales se relacionan con las pruebas utilizadas para este fin y no necesariamente ligada a un fallo terapéutico, ni a una mala adherencia del paciente. Sin embargo, si la carga viral aumenta entre 500 y 5 000 copias/mL se recomienda un seguimiento riguroso del paciente más que un cambio de terapia (211).

Si no se logra disminuir la CV, se debe valorar el cambio de terapia, ya que se considera que es sub-óptima y si se mantiene durante un tiempo prolongado facilita la replicación viral. Inicialmente el virus mutado tiene menor capacidad replicativa con respecto al virus salvaje, por lo que la CV solo alcanza valores bajos. Con el tiempo aparecen las mutaciones secundarias o compensatorias, que por sí solas no llegan a conferir resistencia. Sin embargo, disminuyen la sensibilidad del virus a la terapia y compensan la capacidad replicativa del virus mutado, conduciendo al incremento de la carga viral (212-215).

En general los valores de carga viral de las muestras de pacientes tratados eran altos, indicando un fallo a la TARVAE de larga evolución. Otra explicación posible puede ser la mala adherencia a la TARVAE. Esto permite la replicación del virus salvaje y conduce a la destrucción de los linfocitos T CD4+, como parte del curso natural de la infección por VIH (216-219).

Como se observa en la tabla 8, en general, la mediana de la fecha de inicio de la TARVAE fue de tres años (RIC: 1,1 a 5,6); todos los pacientes recibieron ITIAN; mientras que el 90,1% (526/584) alguna vez recibió ITINAN y el 62,7% (366/584) IP. Sólo el 12,8% (75/584) de los pacientes recibieron regímenes de mono o bi-terapia. En el momento de solicitar las pruebas de resistencia, los ARV indicados más frecuentemente fueron el 3TC (92,5%; 540/584), el AZT (44,7%; 261/584) y la NVP (44,2%; 258/584) (Tabla 8). Al momento de la realización de este estudio los regímenes terapéuticos indicados con mayor frecuencia en la terapia cubana de primera línea fueron: 3TC+AZT+NVP y 3TC+d4T+NVP. El 3TC fue el medicamento que más se empleó en todas las combinaciones. Esto se debió a que los medicamentos genéricos producidos en Cuba durante los años en que se realizó el presente trabajo eran: AZT, d4T, ddI, lamivudina (3TC), NVP e IDV.

Tabla 8: Características demográficas, epidemiológicas y terapéuticas de los pacientes estudiados entre los años 2009-2014.

| Características | Total [N (%)] | No Tratados [N (%)] | Tratados [N (%)] |
|---|---|---|---|
| **Total de pacientes** | 926 (100) | 342 (36,9) | 584 (63,1) |
| **Edad, mediana en años (RIC)** | 37,8 (30,0-45,0) | 32,4 (24,6-41,3) | 40,5 (33,6-46,6) |
| **Sexo masculino [n (%)]** | 771 (83,3) | 290 (82,6) | 481 (82,4) |
| **HSH [n (%)]** | 711 (76,8) | 270 (76,9) | 441 (75,5) |
| **Conteo de los linfocitos T CD4+, mediana células/mm3 (RIC)** | 241(138-382) | 349(201-479) | 208 (111-305) |
| **Carga Viral, mediana Copias de ARN/mL (RIC)** | 20 000 (3 966-80 458) | 18 966 (3 794-84 768) | 21 264 (4 052-80 458) |
| **Estado de la infección por VIH [n (%)]** | | | |
| **Diagnóstico reciente** [≠] | 199 (21,5) | 178 (52,0) | 21 (3,6) |
| **Infección crónica** [+] | 727 (78,5) | 164 (48,0) | 563 (96,4) |
| **Tiempo desde el inicio de la terapia, mediana en años (RIC)** | 3,0 (1,1-5,6) | - | 3,0 (1,1-5,6) |
| **≤12 meses** | 44 (7,5) | - | 44 (7,5) |
| **12,1–24 meses** | 50 (8,6) | - | 50 (8,6) |
| **24,1–36 meses** | 59 (10,1) | - | 59 (10,1) |
| **36,1–48 meses** | 57 (9,8) | - | 57 (9,8) |
| **48,1–60 meses** | 67 (11,5) | - | 67 (11,5) |
| **60,1–72 meses** | 48 (8,2) | - | 48 (8,2) |
| **72,1–84 meses** | 45 (7,7) | - | 45 (7,7) |
| **>84 meses** | 214 (36,6) | - | 214 (36,6) |
| **Exposición previa a la terapia** | | | |
| **Mono- o bi-terapia** | 75 (12,8) | - | 75 (12,8) |
| **ITIAN** | 584 (100,0) | - | 584 (100,0) |
| **ITINAN** | 526 (90,1) | - | 526 (90,1) |
| **IP** | 366 (62,7) | - | 366 (62,7) |
| **Número de terapias previas** | | | |
| **1** | 176 (30,1) | - | 176 (30,1) |
| **2** | 144 (24,7) | - | 144 (24,7) |
| **3** | 94 (16,1) | - | 94 (16,1) |
| **4** | 72 (12,3) | - | 72 (12,3) |
| **5** | 29 (5,0) | - | 29 (5,0) |
| **6** | 32 (5,5) | - | 32 (5,5) |
| **>=7** | 37 (6,3) | - | 37 (6,3) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **TARVAE al momento de la prueba de resistencia** | | | |
| **ITIAN** | | | |
| 3TC | 540 (92,5) | - | 540 (92,5) |
| ABC | 93 (15,9) | - | 93 (15,9) |
| AZT | 261 (44,7) | - | 261 (44,7) |
| d4T | 129 (22,1) | - | 129 (22,1) |
| FTC | 17 (2,9) | - | 17 (2,9) |
| TDF | 93 (15,9) | - | 93 (15,9) |
| **ITINAN** | | | |
| EFV | 54 (9,2) | - | 54 (9,2) |
| NVP | 258 (44,2) | - | 258 (44,2) |
| **IP** | | | |
| ATV/r | 5 (0,9) | - | 5 (0,9) |
| FPV/r | 71 (12,2) | - | 71 (12,2) |
| IDV/r | 37 (6,3) | - | 37 (6,3) |
| LPV/r | 63 (10,8) | - | 63 (10,8) |
| NFV | 40 (6,8) | - | 40 (6,8) |
| SQV/r | 52 (8,9) | - | 52 (8,9) |
| TPV/r | 5 (0,9) | - | 5 (0,9) |

N, n: Número de pacientes, ITIAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, ITINAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos, RIC: Rango inter-cuartil, HSH: Hombres que tienen sexo con hombres, TARVAE: Terapia antirretroviral altamente efectiva, IP: Inhibidores de la proteasa, 3TC: lamivudina, ABC: abacavir, AZT: zidovudina, d4T: stavudina, FTC: emtricitabina, TDF: tenofovir, DLV: delavirdina, EFV: efavirenz, ETR: etravirina, NVP: nevirapina, ATV: atazanavir, DRV: darunavir, FPV: fosamprenavir, IDV: indinavir, LPV: lopinavir, NFV: nelfinavir, SQV: saquinavir, TPV: tipranavir, /r: ritonavir.

Hasta la fecha la TARVAE del VIH es el elemento que más repercute en la incidencia del VIH, esto se demostró en los resultados de los estudios aleatorios controlados que se realizaron hasta la fecha (149, 151). Los resultados iniciales del estudio PARTNER indicaron que no ocurre transmisión del VIH en parejas sero-discordantes al mantener relaciones sexuales sin protección. Siempre que la persona que vive con VIH reciba TARVAE y tenga supresión viral (carga viral no detectable), ya sea en parejas heterosexuales (220) u homosexuales (150).

En Cuba, en el año 2001 se inició la TARVAE, incorporándose paulatinamente a los pacientes, hasta que en el año 2003 se alcanzó la cobertura completa de todos aquellos que la necesitaban (221). Los individuos estudiados en el presente trabajo, que habían estado expuestos previamente a regímenes de biterapia iniciaron la TARVAE antes del año 2003. La prevalencia elevada de la resistencia a los ARVs ha sido justificada frecuentemente, como resultado del empleo de las mono y bi-terapias (222, 223). Se conoce que la exposición a la monoterapia por tiempo prolongado y los cambios frecuentes de regímenes terapéuticos, contribuyen a la emergencia de la resistencia a los ARV (224-226). Esto pudiera limitar el número de opciones terapéuticas que se pueden utilizar en el paciente.

En los países en vías de desarrollo, como Chile, Venezuela, y la India el tipo de medicamento que se emplea en la combinación de la TARVAE es similar a los empleados en Cuba. Sus esquemas de TARVAE son muy similares a los de Cuba, muestran cifras de resistencia muy similares en algunos casos y en otros, más altas que las encontradas en este trabajo (227-229). Sin embargo, en los países con recursos económicos elevados se incorporaron medicamentos mucho más potentes y con barrera genética más alta a estas mismas combinaciones de primera línea. Algunos ejemplos son el Tenofovir (TDF), la Etravirina (ETV) y el Darunavir (DRV). Se plantea que la primera línea de terapia debe ser lo más potente posible para lograr la reducción eficiente de la replicación viral. Esto se hace con el objetivo de impedir o retardar la emergencia de los virus mutantes resistentes, lo que evita el cambio frecuente de los regímenes terapéuticos (215, 230, 231).

### IV.2.2. Diversidad del VIH.

En el presente estudio el subtipo B se observó con mayor frecuencia, pero la mayoría de las muestras eran de formas recombinantes en general. El subtipo B se detectó en el 30,9% (286/926) de las muestras, las FRCs(20,23,24)_BGs se observaron en el 22,0% (204/926),

la FRC19_cpx en el 18,3 % (169/926) y la FRC18_cpx en el 9,8% (91/926). Sólo el 5,5% (51/926) de las muestras eran de virus del subtipo C, mientras que otros subtipos, FRCs y FRUs se observaron en una frecuencia de 13,5% (125/926). No se observaron diferencias significativas entre las frecuencias de subtipos de VIH-1 identificados en muestras obtenidas de individuos no tratados comparados con las de los pacientes tratados (Tabla 9).

**Tabla 9: Prevalencia de los subtipos del HIV-1 entre los años 2009-2014.**

| | Total [N (%)] | No tratados [N (%)] | Tratados [N (%)] |
|---|---|---|---|
| **Subtipos** | 926 (100) | 342 (100) | 584 (100) |
| **B** | 286 (30,9) | 104 (30,4) | 182 (31,2) |
| **C** | 51 (5,5) | 12 (3,5) | 39 (6,7) |
| **FRC 18_cpx** | 91 (9,8) | 35 (10,2) | 56 (9,6) |
| **FRC 19_cpx** | 169 (18,3) | 65 (19.0) | 104(17.8) |
| **FRC(20,23,24)_BGs** | 204 (22,0) | 91 (26,6) | 113 (19,3) |
| **Otros** | 125 (13,5) | 35 (10,2) | 90 (15,4) |

N: Número de pacientes, FRC: Formas Recombinantes Circulantes.

El estudio de las variantes genéticas del VIH-1 permite conocer la epidemiología de la infección. La variación entre los diferentes subtipos puede afectar el desarrollo de las nuevas estrategias terapéuticas y de nuevas formulaciones de candidatos vacunales (11, 232, 233). Adicionalmente, debe investigarse la distribución de los subtipos y las formas recombinantes ya que la variabilidad genética puede influir en el rendimiento de las pruebas de determinación de la carga viral y de la resistencia a los ARVs (234).

Los resultados de este estudio presentan una síntesis de las variantes genéticas de VIH-1 circulantes y de la frecuencia de la resistencia del VIH-1 a los ARVs en Cuba. En esta investigación los subtipos no-B del VIH-1 fueron los más prevalentes (69,1%, 640/926). Estos resultados están en concordancia con la alta diversidad genética del VIH-1 en Cuba que se demostró en estudios previos (19, 205), en contraste con la alta proporción del subtipo B en el Caribe (235, 236). La gran diversidad genética del VIH-1 en Cuba se ha propuesto que se atribuye al origen de la epidemia cubana de VIH a partir de contactos con la epidemia de VIH de África Central (13, 19, 20).

Estudios de la diversidad genética del VIH-1 en Cuba realizados desde el año 2001, sugieren una tendencia a la disminución en la frecuencia del subtipo B y un incremento de la circulación de las FRC(20, 23, 24)_BG en Cuba. En un primer trabajo que realizó Ruibal y colaboradores, se informó un predominio del subtipo B, presente en el 78,6% de las muestras que se analizaron (237). En el estudio de Cuevas y cols. en el 2002 el subtipo B se

detectó en el 48,0% de las muestras (21). Pérez y cols. en los años 2006 y 2007 estudiaron la epidemiología molecular y la resistencia genotípica del VIH-1 en Cuba e informaron una disminución de la circulación del subtipo B y la expansión de las FRC(20,23,24)_BG (15, 19). Los resultados del presente estudio, combinado con los informes recientes, indicaron que los subtipos no B son los más frecuentes en Cuba y demostraron el predominio de las cinco FRC cubanas de VIH-1 (48,5%) (15, 16, 19, 205, 206, 238).

El presente estudio confirmó la expansión de las FRC(20,23,24)_BG que se informó anteriormente, pues el 22,0% de las muestras pertenecieron a estas FRCs. El aumento de la frecuencia de las formas recombinantes se informó en otras regiones como Myanmar Central (239), Sur de China (240), Este de África (241, 242), Argentina (243, 244) y Brasil (245). Aulicino, P. C. y cols. observaron un aumento en la circulación de las formas recombinantes BF en Argentina y lo atribuyeron a la mayor adecuación evolutiva del recombinante BF respecto a los subtipos B o F puros (246). En un estudio realizado en una clínica en Madrid, España, también se observó un incremento de la frecuencia de los subtipos no-B y las formas recombinantes representando la tercera parte de los casos (247). Foster G. M. y cols. informaron que la dinámica de la epidemia de VIH-1 en el Reino Unido cambió, y se produjo una expansión geográfica de la forma recombinante FRC50_A1D. Además, observaron que aumentó su transmisión en los usuarios de drogas intravenosas, en hombres y en mujeres heterosexuales (248).

Se plantea que la expansión de las diferentes formas recombinantes pudiera deberse a los patrones de conducta sexual predominantes en las epidemias de VIH-1 de los países. Sin descartar la posibilidad de una mayor adecuación evolutiva dada por una mayor capacidad replicativa y eficiencia de transmisión de las FRC(20,23,24)_BG (15). Kourí y cols. en el año 2015, informaron que la forma recombinante FRC19_cpx presenta una alta adecuación evolutiva, que pudiera causar la frecuencia alta de progresión rápida a SIDA en Cuba (16). Este resultado confirma la importancia de la vigilancia de la variabilidad genética del VIH-1 en Cuba.

Es preocupante la prevalencia alta de las FRCs(20,23,24)_BG que se detectan en la región *gag/pol* (teniendo en cuenta que estas formas recombinantes son subtipo G en su gen *pol*). Se conoce que éstas formas recombinantes no se detectan o se sub-cuantifican en algunos ensayos comerciales de carga viral (249-251), especialmente en el ensayo NucliSens HIV-1

QT (Biomérieux, Francia), que es el que se utiliza en el IPK (252). Si este ensayo no es capaz de detectar correctamente la carga viral de los pacientes infectados con estos subtipos, podrían obtenerse cargas virales sub-cuantificadas en pacientes bajo TARVAE. Esto conduciría a un fallo a la terapia por largo tiempo y se traduciría en resultados discordantes entre el deterioro inmunológico (disminución de los linfocitos T CD4+) y niveles no detectables de carga viral (falsos negativos). Como resultado dificultaría definir la conducta terapéutica a seguir con estos pacientes.

A pesar de lo antes planteado, en los países del continente americano, el subtipo B aún es el mayoritario, probablemente porque sus epidemias de VIH no han tenido un vínculo directo con la epidemia de África. Por lo tanto, la recombinación entre las diversas variantes virales de los diferentes subtipos es menos probable. Los estudios realizados de las epidemias de Brasil (253), Chile (254), Argentina (255) y otros países de la región, corroboran que el subtipo B es el que predomina. Sin embargo, también se informó que predomina la circulación de las formas recombinantes BF en Argentina, Bolivia, Brasil y Uruguay (246, 256, 257).

### IV.2.3. Mutaciones de resistencia a los ARVs en los pacientes sin tratamiento previo.

En general, la frecuencia de las mutaciones de resistencia en los pacientes infectados con VIH-1 sin TARVAE previa fue de 11,4% (39/342). La resistencia a los medicamentos de una sola clase estuvo presente en el 51,3% (20/39) de los pacientes. Se encontraron mutaciones solo a los ITIAN en el 20,5% (8/39), solo a los ITINAN en el 12,8% (5/39) y solo a los IP en el 17,9% (7/39) de ellos. Se observó una frecuencia elevada de la resistencia a dos clases de ARVs (43,6%, 17/39), principalmente resistencia simultánea a ITIAN+ITINAN (41,0%, 16/39). Solo en una muestra se observó resistencia a los ITIAN+IP (2,6%, 1/39) y en otras dos (5,1%, 2/39) se observaron mutaciones de resistencia a tres clases ITIAN+ITINAN+IP (Tabla 10).

La incidencia global de las mutaciones de resistencia fue similar entre los pacientes con infección crónica (48,7%, 19/39) y los individuos con diagnóstico reciente (51,3%, 20/39). La frecuencia de alguna mutación de resistencia a los ITIAN fue mayor en los individuos con infección crónica que en aquellos con diagnóstico reciente (78,9% (15/19) y 60,0% (12/20), respectivamente). Sin embargo, la frecuencia de alguna mutación de resistencia a ITINAN fue mayor en los individuos diagnosticados recientemente que en los de infección

crónica (50,0% (10/20) y 42,1% (8/19), respectivamente). Lo mismo se observó para las mutaciones de resistencia a los IP (30,0% (6/20) y 21,1% (4/19), respectivamente). La frecuencia de la resistencia simultánea a las dos clases ITIAN+ITINAN fue mayor en los individuos con diagnóstico reciente que en aquellos con infección crónica (45,0% (9/20) y 36,8% (7/19), respectivamente). Para la resistencia doble a ITIAN+IP, la frecuencia fue más alta en la infección crónica (5,3% (1/19 y ninguno en el caso de los pacientes recién diagnosticados). Las mutaciones de resistencia simultánea a las tres clases también fueron más prevalentes en individuos con infección crónica (5,3% y 5,0%), aunque solo se observó un caso en cada grupo (Tabla 10).

Tabla 10: Frecuencia de las mutaciones de resistencia del VIH-1 a los ARVs en individuos no tratados previamente con terapia antirretroviral entre los años 2009-2014..

| Mutaciones de resistencia | Total [N (%) | Diagnóstico Reciente [N (%)] | Infección Crónica [N (%)] |
|---|---|---|---|
| **Alguna mutación** | 39 (100) | 20 (51,3) | 19 (48,7) |
| **MVRA solo a ITIAN** | 8 (20,5) | 2 (10,0) | 6 (31,6) |
| **Alguna mutación a ITIAN** | 27 (69,2) | 12 (60,0) | 15 (78,9) |
| **M41L** | 6 (15,4) | 3 (15,0) | 3 (15,8) |
| **D67N/G** | 7 (17,9) | 2 (10,0) | 5 (26,3) |
| **M184V/I** | 18 (46,2) | 6 (30,0) | 12 (63,2) |
| **T215Y/I/S/D** | 10 (25,6) | 4 (20,0) | 6 (31,6) |
| **K219Q/E/N/R** | 8 (20,5) | 5 (25,0) | 3 (15,8) |
| **MVRA solo a ITINAN** | 5 (12,8) | 3 (15,0) | 2 (10,5) |
| **Alguna mutación a ITINAN** | 18 (46,2) | 10 (50,0) | 8 (42,1) |
| **K103N** | 9 (23,1) | 5 (25,0) | 4 (21,1) |
| **Y181C/I** | 11 (28,2) | 6 (30,0) | 5 (26,3) |
| **G190A** | 7 (17,9) | 6 (30,0) | 1 (5,3) |
| **MVRA solo a IP** | 7 (17,9) | 5 (25,0) | 2 (10,5) |
| **Alguna mutación a IP** | 10 (25,6) | 6 (30,0) | 4 (21,1) |
| **M46I/L** | 6 (15,4) | 4 (20,0) | 2 (10,5) |
| **V82A** | 3 (7,7) | 0 (0,0) | 3 (15,8) |
| **L90M** | 3 (7,7) | 1 (5,0) | 2 (10,5) |
| **ITIAN+ITINAN** | 16 (46,2) | 9 (45,0) | 7 (36,8) |
| **ITIAN+IP** | 1 (2,6) | 0 (0,0) | 1 (5,3) |
| **ITIAN+ITINAN +IP** | 2 (5,1) | 1 (5,0) | 1 (5,3) |

N: Número de pacientes, MVRA: Mutaciones de vigilancia de la resistencia a los ARVs, ITIAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, ITINAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos, IP: Inhibidores de la proteasa.

Las mutaciones más frecuentemente observadas en la región de la TI, relacionadas con la resistencia a los ITIAN y los ITINAN fueron: M184V/I (46,2%, 18/39), Y181C/I (28,2%,

11/39), T215Y/I/S/D (25,6%, 10/39), K103N (23,1%, 9/39), K219Q/E/N/R (20,5%, 8/39), D67N/G y G190A (17,9%, 7/39), y M41L (15,4%, 6/39). Dentro de la PR la M46I/L fue la mutación más frecuente (15,4%, 6/39), seguida de la L90M y la V82A (7,7%, 3/39).

La frecuencia de las mutaciones de resistencia fue ligeramente mayor en los individuos crónicamente infectados que en los de diagnóstico reciente, excepto para la M46I/L (Tabla 10). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de las mutaciones de resistencia entre ambos grupos.

En Cuba se lograron grandes avances en la disminución de la morbilidad y la mortalidad relacionada con el VIH/SIDA, gracias al acceso universal y gratuito a la TARVAE. Las pruebas de resistencia a los ARVs no estuvieron disponibles en Cuba hasta mayo del año 2009. Por lo tanto, un número sustancial de pacientes con fallo virológico pudieran haber sido tratados con regímenes terapéuticos sub-óptimos durante periodos de tiempo prolongados. Su evolución clínica pudo afectarse por la aparición de resistencia del VIH-1 a los medicamentos.

La frecuencia de las mutaciones de resistencia en individuos no tratados que se observó en el presente estudio es superior a la que se encontró en los estudios previos realizados en Cuba. Pérez y cols., en el año 2003, efectuaron un estudio en muestras de pacientes cubanos sin TARVAE previa y observaron una frecuencia baja de mutaciones de resistencia a los ITIAN, sin evidencia de mutaciones de resistencia a ITINAN ni a IP (19). Machado y cols. entre los años 2009-2011, observaron una frecuencia moderada de las mutaciones de resistencia a ITIAN y a ITINAN, mientras que informaron una frecuencia baja de las mutaciones de resistencia a IP (205). Además, encontraron una frecuencia alta de las mutaciones de resistencia a ITIAN y a IP. Sin embargo, la frecuencia de las mutaciones de resistencia a los ITINAN sigue siendo moderada, pero superior a los informes anteriores (19, 205). Los resultados del estudio actual, en comparación con estudios previos, indicaron una tendencia creciente en la frecuencia de las mutaciones de resistencia a la TARVAE.

Los resultados de este trabajo también informan una frecuencia mayor de las mutaciones de resistencia en Cuba en individuos sin tratamientos anteriores, en comparación con los países del Caribe, México y América Central, sobre la base de los informes más recientes. Myers J.E. y cols. señalaron que la emergencia de la resistencia del VIH-1 a los ARVs es

una consecuencia preocupante de la escalada global de disponibilidad de la TARVAE. Estos autores, investigaron en República Dominicana la resistencia transmitida y encontraron que la prevalencia de la transmisión de mutaciones de resistencia a los ITIAN y a los ITINAN fue solo de 1,0% y 6,8 % respectivamente (258). Barrow y cols. realizaron un estudio acerca de este tema en Jamaica, y encontraron una prevalencia moderada de resistencia transmitida que alcanzó un 9,7% (259). En México, Escoto-Delgadillo y cols. estudiaron la resistencia del VIH-1 a los ARVs entre los años 2005 y 2015 en individuos sin tratamiento. Como resultado observaron que en esos diez años no se han producido cambios sustanciales en la prevalencia de resistencia transmitida, la cual se ha mantenido alrededor del 7,4% (260). Ávila-Ríos y cols, realizaron un estudio en Guatemala en el año 2015 donde observaron que las mutaciones de resistencia transmitida (156), estaban presentes en el 7,3% de las muestras estudiadas (261). En un estudio realizado en El Salvador por Holguín y cols. la prevalencia de las mutaciones de resistencia transmitida fue de 5,7% (262). Ávila-Ríos y cols. en el año 2015, investigaron la prevalencia de la resistencia a los ARVs en Honduras y observaron valores de resistencia en individuos no tratados muy similares a los encontrados en esta investigación (11,5%) (263). Mendoza y cols. en el año 2016 informaron que en Panamá la prevalencia de resistencia en individuos no tratados era de un 9,2% (264).

Actualmente las guías de la OMS establecen que debe realizarse la vigilancia de la resistencia del VIH a los ARV en individuos que inician el tratamiento, para definir la terapia de primera línea en cada país (265). La realización de esos estudios requiere una selección aleatoria y representativa de las muestras. Sin embargo, el estudio actual se realizó antes que la OMS estableciera esas pautas y no cumple con estos requerimientos, lo cual constituye una limitación del mismo.

Machado y cols., en el año 2019, publicaron un estudio que cumple las recomendaciones de la OMS para la vigilancia de la resistencia del VIH-1 a los ARVs en individuos sin tratamiento previo. Los autores estudiaron la resistencia del VIH-1 a los ARV en individuos no tratados en Cuba y observaron una prevalencia casi tres veces mayor a la encontrada en el presente estudio (29,8%) (221). Los resultados de la presente investigación y los obtenidos por Machado, L y cols., resaltan la importancia de seguir las orientaciones actuales de la OMS para realizar los estudios de vigilancia de la resistencia a los ARV.

Aunque también pudiera reflejar un incremento en la resistencia transmitida ya que el periodo que estudiaron Machado y cols. fue de enero a junio del año 2017 (221).

### IV.2.4. Mutaciones de resistencia a los ARVs en pacientes con tratamiento.

El 89,6% (523/584) de los pacientes estudiados estaban infectados con virus resistentes a alguno de los ARVs que se emplean en la TARVAE en Cuba y el 80,0% (467/584) tenían al menos una mutación de resistencia a los ITIAN. Las mutaciones más frecuentes a esta clase de ARV fueron: M184V/I (75,9%, 443/584), T215Y/F (37,3%, 218/584), M41L (25,7%, 150/584), D67N (24,0%, 140/584), K219Q/E (22,9%, 134/584), K70R/E (21,2%, 124/584) y la L210W (13,7%, 80/584). Las mutaciones de resistencia a los ITINAN estaban presentes en el 71,4%(417/584) de los pacientes. Las más frecuentes fueron la K103N/S (28,6%, 167/584), Y181C/I/V (26,4%, 154/584), G190S/A (21,7%, 127/584), K101P/E/H (11,0%, 77/584) y la H221Y (10,8%, 63/584). El 31,7% de los pacientes (185/584) tenían mutaciones de resistencia a los IP, las más comunes fueron la L90M (16,3%, 95/584), M46I/L (15,9%, 93/584) y la V82A/T/F/S (10,3%, 60/584) (Tabla 11).

En los pacientes que no respondían a la TARVAE de primera línea, se observaron mutaciones asociadas con los ITIAN, ITINAN e IP en el 74,4% (131/176), 69,9% (123/176) y el 9,7% (17/176) de las muestras, respectivamente. En los que no respondían al tratamiento de segunda línea, las frecuencias de mutaciones fueron del 79,2% (114/144), el 72,2% (104/144) y 31,9% (46/144), respectivamente. En los que se expusieron a 3 o más regímenes de tratamiento, estos valores aumentaron a 84,1% (222/264), 72,0% (190/264) y 60,2% (122/264), respectivamente (Tabla 11).

La frecuencia de las mutaciones de resistencia a cualquier clase de fármacos fue significativamente mayor en los pacientes expuestos a tres o más regímenes de tratamiento ($p=0,0149$; OR=2,1; IC: 1,1-3,8). Las mutaciones de resistencia a ITIAN+ITINAN se observaron más frecuentemente en los pacientes expuestos a dos tratamientos ($p=0,0017$; OR=2,0; IC: 1,3-3,2). Lo mismo se detectó para las mutaciones de resistencia a ITIAN+IP ($p=0,0000$; OR=14,2; IC: 6,6-30,5) y para las mutaciones de resistencia a las tres familias de ARVs ($p=0,0067$; OR: 2,0; IC: 1,2-3,4). Para las mutaciones de resistencia a los ITIAN, ITINAN y a los IP, se observaron diferencias significativas entre la frecuencia en los pacientes expuestos a 1 o 2 terapias en comparación con los tratados con ≥ 3 regímenes ($p<0,001$).

Algunas mutaciones a ITIAN aumentaron significativamente su frecuencia de observación en los individuos expuestos a dos regímenes de terapia en comparación con los expuestos a un régimen. La M41L aumentó de 17,6% (31/176) a 27,1% (39/144; p=0,0415; OR=1,7; IC: 1,0-3,0), D67N del 12,5% (22/176) al 22,9% (33/144; p=0,0140; OR=2,1; IC: 1,2-3,8) y la L74V desde el 1,7% (3/176) hasta el 11,1% (16/144; p=0,0010; OR=7,2; IC: 2,1-25,3). Además la T215Y/F aumentó del 27,3% (59/176) al 41,0% (48/144; p=0, 0098; OR=1,9; IC: 1,2-3,0) y la K219Q/E de 13,1% (23/176) a 21,5% (31/144; p=0,0444; OR: 1,8; IC: 1, 0-3,3). Las mutaciones K70R/E y L210W aumentaron significativamente de 14,2% (25/176) y 8,0% (14/176) en la primera línea hasta 25,4% (67/264; p=0,0047; OR=2,1; IC: 1,2-3,4) y 17,0% (45/264; p=0,0061; OR=2,4; IC: 1,3-4,5) después de la tercera línea, respectivamente (Tabla 11).

El número de pacientes infectados con virus con mutaciones de resistencia a los ITINAN no aumentó significativamente después de 2 o >=3 regímenes de tratamiento. Sin embargo, la frecuencia de la mutación K103N/S fue significativamente mayor (p=0,0402; OR: 1,6; CI: 1,0-2,4) en los pacientes expuestos a 3 o más regímenes (33,0%, 87/264). Lo mismo se observó para la mutación V108I (23,7%; 42/176; p=0,0049; OR=3,0; IC: 1,4-6,7) (Tabla 11).

Sólo tres mutaciones asociadas a la resistencia del VIH-1 a los IP aumentaron significativamente su frecuencia de aparición después del segundo fallo terapéutico. D30N aumentó del 0,0% (0/176) al 7,6% (11/144; p=0,0009; OR=30,4; CI 1,8-520,6), I84V del 0,6% (1/176) al 4,9% (7/144; p=0,0452; OR=6,4; IC: 1,1-37,4) y L90M del 5,1% (9/176) al 13,9% (20/144; p=0,0071; OR=2,9, IC 1,3-6,5). Otras aumentaron significativamente después de 3 o más regímenes, V32I desde el 0,6% (1/176) al 4,5% (12/264; p=0,0335; OR=8,3; IC:1,1-64,7), M46I/L de 5,1% (9/176) a 26,5% (70/264; p=0,0000; OR=7,0; IC:3,2-13,8), I47V/A de 0,0% (0/176) a 6,8% (18/264; p=0,0016; OR=26,5; IC:1,6-442,5), I50L/V de 0,6% (1/176) a 5,3% (14/264; p=0,0220; OR=6,8; IC:1,2-36,8), I54L/M de 0,0% (0/176) a 9,5% (25/264; p=0,0001; OR=37,6;IC:2,3-621,5), V82A/T/F/S de 3,4% (6/176) a 17,0% (45/264; p=0,0000; OR=5,4; IC:2,03-12,07), I84V desde el 0,6% (1/264) hasta el 13,6% (36/264; p=0,0000; OR=18,7; IC:3,6-96,8) y L90M del 5,1% (9/176) al 25,0% (66/264; p=0,0000; OR=5,9, IC:2,9-12,0) (Tabla 11).

Como parte del Plan de Acción Global para el enfrentamiento de la resistencia del VIH a los ARVs, la OMS recomienda la vigilancia de la resistencia adquirida a los medicamentos en dos momentos diferentes. El primero es el punto de tiempo temprano, que incluye a las personas que han estado bajo TARVAE durante 12 (±3) meses y el segundo es el punto de tiempo tardío, que incluye a personas que han estado bajo TARVAE por 48 meses o más. Sólo 17 (2,9%) individuos en nuestra base de datos cumplen los criterios para el punto de tiempo temprano, este número de individuos es demasiado bajo, por lo que carece de valor para cualquier apreciación estadística en el presente estudio.

Tabla 11: Frecuencia de las mutaciones de resistencia del VIH-1 a los ARVs, en pacientes que no responden al tratamiento entre los años 2009-2014.

| Mutaciones | Total [N (%)] | Exposición previa a la terapia N (%) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 régimen | 2 regímenes | ≥3 regímenes |
| | 584 (100) | 176 (100) | 144 (100) | 264 (100) |
| **ITIAN** | | | | |
| **Alguna mutación a ITIAN** | 467 (80,0) | 131 (74,4) | 114 (79,2) | 222 (84,1) |
| **M41L** | 150 (25,7) | 31 (17,6) | 39 (27,1) | 80 (30,3) |
| **K65R/E/N** | 17 (2,9) | 5 (2,8) | 1 (0,7) | 11 (4,2) |
| **D67N** | 140 (24,0) | 22 (12,5) | 33 (22,9) | 85 (32,2) |
| **K70R/E** | 124 (21,2) | 25 (14,2) | 32 (22,2) | 67 (25,4) |
| **L74V** | 53 (9,1) | 3 (1,7) | 16 (11,1) | 34 (12,9) |
| **V75I** | 21 (3,6) | 7 (4,0) | 4 (2,8) | 10 (3,8) |
| **F77L** | 8 (1,4) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 8 (3,0) |
| **Y115F** | 16 (2,7) | 2 (1,1) | 2 (1,4) | 12 (4,5) |
| **F116Y** | 6 (1,0) | 0 (0,0) | 1 (0,7) | 5 (1,9) |
| **Q151M** | 12 (2,1) | 1 (0,6) | 2 (1,4) | 9 (3,4) |
| **M184V/I** | 443 (75,9) | 126 (71,6) | 107 (74,3) | 210 (79,5) |
| **L210W** | 80 (13,7) | 14 (8,0) | 21 (14,6) | 45 (17,0) |
| **T215Y/F** | 218 (37,3) | 48 (27,3) | 59 (41,0) | 111 (42,0) |
| **K219Q/E** | 134 (22,9) | 23 (13,1) | 31 (21,5) | 80 (30,3) |
| **ITINAN** | | | | |
| **Alguna mutación a ITINAN** | 417 (71,4) | 123 (69,9) | 104 (72,2) | 190 (72,0) |
| **L100I** | 10 (1,7) | 0 (0,0) | 3 (2,1) | 7 (2,7) |
| **K101E/P** | 64 (11,0) | 22 (12,5) | 15 (10,4) | 27 (10,2) |
| **K103N/S** | 167 (28,6) | 42 (23,9) | 38 (26,4) | 87 (33,0) |
| **V106M/A** | 36 (6,2) | 17 (9,7) | 7 (4,9) | 12 (4,5) |
| **V108I** | 49 (8,4) | 8 (4,5) | 8 (5,6) | 33 (12,5) |
| **E138A/G/K/Q** | 38 (6,5) | 14 (8,0) | 13 (9,0) | 11 (4,2) |
| **V179L** | 1 (0,2) | 0 (0,0) | 1 (0,7) | 0 (0,0) |
| **Y181C/I/V** | 154 (26,4) | 44 (25,0) | 39 (27,1) | 71 (26,9) |
| **Y188L/H** | 17 (2,9) | 3 (1,7) | 4 (2,8) | 10 (3,8) |
| **G190S/A** | 127 (21,7) | 33 (18,8) | 35 (24,3) | 59 (22,3) |
| **H221Y** | 63 (10,8) | 22 (12,5) | 14 (9,7) | 27 (10,2) |
| **P225H** | 12 (2,1) | 2 (1,1) | 3 (2,1) | 7 (2,7) |
| **M230I/L** | 9 (1,5) | 3 (1,7) | 3 (2,1) | 3 (1,1) |
| **IP** | | | | |
| **Alguna mutación a IP** | 185 (31.7) | 17 (9.7) | 46 (31.9) | 122 (46.2) |
| **D30N** | 17 (2,9) | 0 (0,0) | 11 (7,6) | 6 (2,3) |
| **V32I** | 16 (2,7) | 1 (0,6) | 3 (2,1) | 12 (4,5) |
| **M46I/L** | 93 (15,9) | 9 (5,1) | 14 (9,7) | 70 (26,5) |
| **I47V/A** | 22 (3,8) | 0 (0,0) | 4 (2,8) | 18 (6,8) |
| **G48V** | 8 (1,4) | 0 (0,0) | 1 (0,7) | 7 (2,7) |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **I50L/V** | 17 (2,9) | 1 (0,6) | 2 (1,4) | 14 (5,3) |
| **I54L/M** | 29 (5,0) | 0 (0,0) | 4 (2,8) | 25 (9,5) |
| **Q58E** | 18 (3,1) | 2 (1,1) | 4 (2,8) | 12 (4,5) |
| **T74P** | 7 (1,2) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 7 (2,7) |
| **L76V** | 10 (1,7) | 0 (0,0) | 2 (1,4) | 8 (3,0) |
| **V82A/T/F/S** | 60 (10,3) | 6 (3,4) | 9 (6,3) | 45 (17,0) |
| **N83D** | 3 (0,5) | 0 (0,0) | 1 (0,7) | 2 (0,8) |
| **I84V** | 44 (7,5) | 1 (0,6) | 7 (4,9) | 36 (13,6) |
| **N88S** | 3 (0,5) | 3 (1,7) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| **L90M** | 95 (16,3) | 9 (5,1) | 20 (13,9) | 66 (25,0) |
| **Alguna** | 523 (89,6) | 149 (84,7) | 131 (91,0) | 243 (92,0) |
| **Alguna ITIAN+ITINAN** | 388 (66,4) | 84 (47,7) | 94 (65,3) | 61 (23,1) |
| **Alguna ITIAN+IP** | 244 (41,8) | 8 (4,5) | 60 (41,7) | 27 (10,2) |
| **Alguna ITIAN+ITINAN+IP** | 194 (33,2) | 32 (18,2) | 45 (31,3) | 117 (44,3) |

N: número de pacientes, ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, ITINAN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos, IP: inhibidores de la proteasa.

En los pacientes tratados, se detectó una frecuencia muy alta de mutaciones asociadas a la resistencia a los ITIAN, los ITINAN y los IP (80,0%, 71,4% y 48,5%, respectivamente). Esto pudiera deberse a la falta de potencia de la combinación de la TARVAE empleada o a la adquisición de virus resistentes a los medicamentos (94, 266).

Las mutaciones de resistencia a ITIAN más frecuentes fueron la M184V/I, que se asocia al tratamiento con 3TC (267) y la T215Y/F, que se selecciona por los análogos de la timidina, como el AZT y el d4T (268, 269). Las mutaciones de resistencia a los ITINAN más frecuentes fueron la K103N/S, que se selecciona por el EFV y confiere resistencia alta a la NVP (126), seguida de la G190S/A, que también confieren resistencia a la NVP (270, 271). En lugares con amplios recursos, la frecuencia alta de la K103N se asocia con fallo a la terapia con EFV (126), pero este ARV no es muy utilizada en Cuba (en este estudio solo el 9,2% de los pacientes tratados la utilizaron). Sin embargo, la NVP es el principal ITINAN utilizado en Cuba, porque se produce en el país y también puede seleccionar esta mutación. Es preocupante la alta frecuencia de la mutación V82A que es seleccionada por el ritonavir y puede producir el fallo al tratamiento con la mayoría de los IP (272). Estos resultados eran esperados, ya que los medicamentos antes mencionados son muy utilizados en Cuba para la primera y segunda línea de tratamiento.

Es alarmante la frecuencia alta de las mutaciones K101E/P y H221Y (12,3% y 10,1% respectivamente), porque ambas confieren resistencia y han sido asociadas con la disminución de la susceptibilidad del VIH-1 a la RPV (273). En Cuba este ARV no se emplea en ninguna línea de tratamiento ni como terapia de rescate, por lo tanto, esto pone en peligro el empleo de esta droga en el futuro (126). En estudios anteriores, Azijn y cols. informaron que la mutación K101P reduce la susceptibilidad del VIH-1 a la RPV en aproximadamente 50 veces y que confiere resistencia cruzada a todos los ITINAN (273). Sin embargo, esta mutación no se observó comúnmente en los pacientes que recibieron tratamiento con este ARV en el año 2011 durante los ensayos clínicos de fase 3 ECHO realizados por Molina y cols. (274). Tampoco en los ensayos clínicos TRIVE, realizados por Cohen y cols. (275). La mutación K101E reduce la susceptibilidad a la RPV entre 2,5 y 3 veces y ocurre comúnmente en los pacientes que se encuentran recibiendo TARVAE con la RPV (126, 273-275). Por su parte, la mutación H221Y es una mutación accesoria que por sí sola tiene efectos mínimos en la susceptibilidad del VIH-1 a los ITINAN y se selecciona frecuentemente por la TARVAE que contenga ritonavir (276-279). Esta mutación se detectó tanto en los ensayos clínicos de fase 3 mencionados anteriormente como en los estudios de caracterización genotípica y fenotípica realizados por Rimsky y cols. en el año 2012 (274-276).

### IV.2.5. Resistencia adquirida en los pacientes expuestos a la terapia.

Los promedios de resistencia adquirida a los ITIAN, los ITINAN y a los IP que se observaron fueron del 52,7%, 54,7% y 21,4%, respectivamente (Figura 6B). Estos promedios aumentaron significativamente a los ITIAN ($p < 0,0001$) y los IP ($p < 0,0001$) en los pacientes que habían fallado a más de dos regímenes de tratamiento ARV (Figura 6B). Los niveles más altos de resistencia a los ITIAN se detectaron para el 3TC/FTC (76,9%) y el ABC (50,2%); en los ITINAN fueron para la NVP (71,2%) y el EFV (70,9%); en los IP fueron al NFV (31,8%), SQV/r (26,4%) y al IDV (25,0%) (Figura 6A).

Se detectó RCC a los ITIAN, los ITINAN y a los IP en el 21,2%, el 32,4% y el 8,0% de las muestras estudiadas, respectivamente. La RCC también se incrementó significativamente para los ITIAN y los IP después de dos fallos a los regímenes de terapia ($p = 0,0001$ y $p < 0,0001$, respectivamente). La RMA se observó en el 4,1% de los pacientes y se

incrementó significativamente después del fallo con dos regímenes de terapia (p = 0,0017) (Figura 6B).

Se observó una disminución significativa de la RCC-ITIAN y la RCC-IP, mientras que la RCC-ITINAN mostró un comportamiento de aumento y disminución a través del tiempo. El análisis estadístico demostró que la RCC-ITIAN disminuyó significativamente, desde el 37,6% en el año 2009 hasta el 9,5% en el 2014 (OR=0,74, IC del 95%: 0,70-0,82; p<0,001). La RCC-IP también tuvo una disminución significativa entre el año 2009 y el 2012, del 24,7% al 0,8% (OR=0,80, IC del 95%: 0,71-0,89; p <0,001), respectivamente. Cuando se estudió la resistencia de cada fármaco en cada clase, se obtuvieron resultados similares a los observados para la resistencia a IP (p <0,001) (Figura 6C). La resistencia a los IP disminuyó a partir del año 2009 hasta el 2013, y luego se incrementó en el año 2014. Esto pudiera deberse al aumento en la prescripción de IP en los últimos años, la que era más alta en el año 2014 que en los años 2012 y 2013. Por otra parte, del año 2009 al 2012, se observó una tendencia significativa a la disminución de la frecuencia de la RMA. Hasta diciembre del año 2009 doce pacientes (12,6%) estaban infectados con un virus multidrogorresistente, mientras que a finales del año 2011 la frecuencia de virus con RMA disminuyó al 2,3% (OR=0,80, IC del 95%: 0,69-0,93; p=0,003) (Figura 6C).

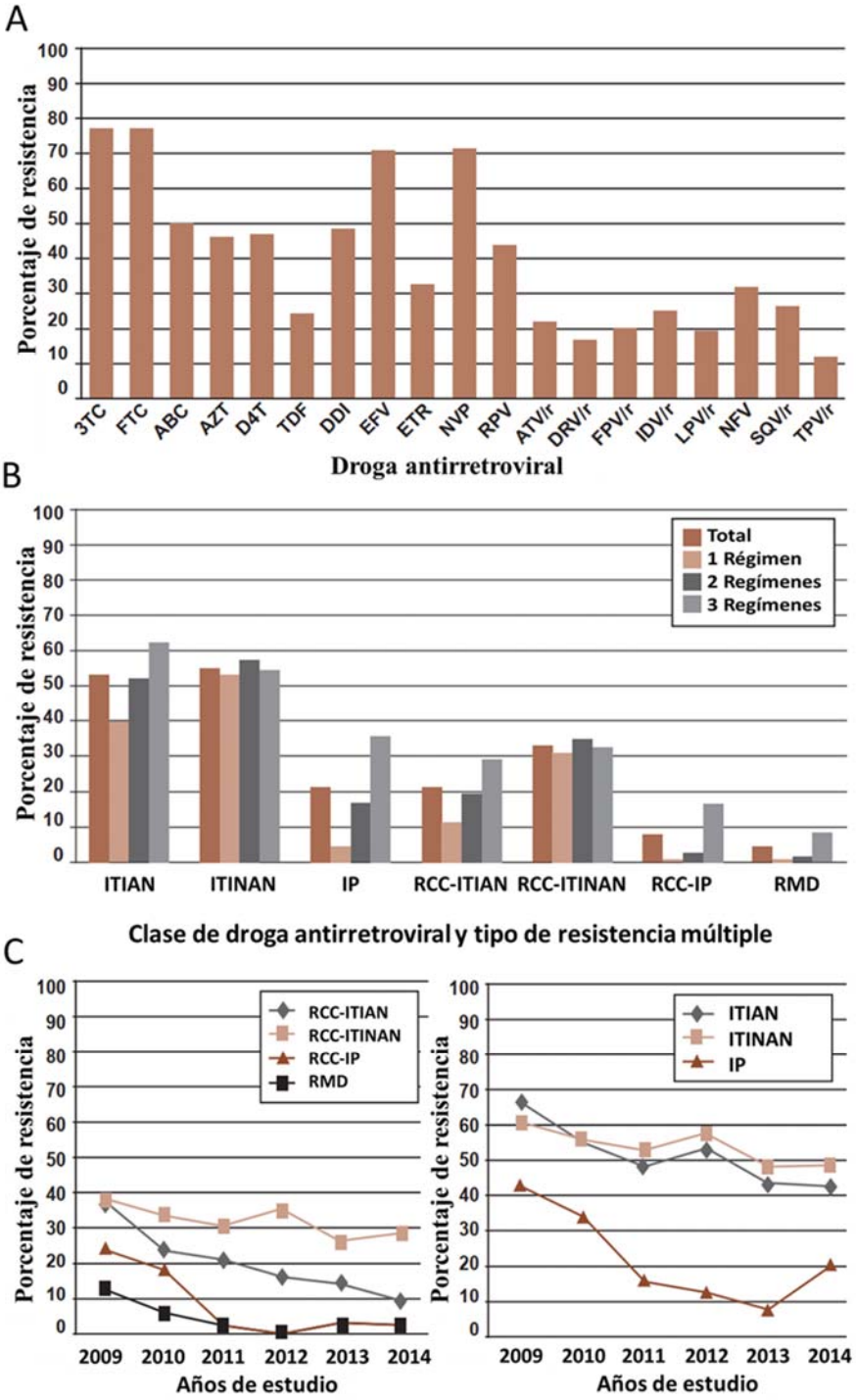



**Figura 6:** Resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales entre los años 2009-2014. Porcentaje de resistencia **A:** a cada antirretroviral. **B:** a cada clase de antirretroviral y de cada tipo de resistencia múltiple según el número de regímenes de terapia. **C:** múltiple y a cada clase de antirretroviral. RCC: resistencia de la clase completa. RMA: resistencia a múltiples antirretrovirales. ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos. ITINAN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleótidos. IP: inhibidor de la proteasa.

Los niveles de resistencia más elevados se observaron para el 3TC/FTC, AZT/d4T, ABC, NVP, EFV, NFV, SQV/r, IDV/r y el LPV/r. Estos resultados se esperaban porque concuerdan con los medicamentos que más se emplearon por los pacientes en el momento que se les indicaron los ensayos genotípicos de resistencia. Además, estos medicamentos forman parte de las combinaciones de ARVs que más se utilizan en la TARVAE en Cuba y pudieron haberse utilizado por los pacientes en regímenes de terapia anteriores.

En el presente estudio, la resistencia que se observó a los ITIAN, los ITINAN y a los IP fue superior a la que informaron Pérez y cols. en una investigación realizada en Cuba en el año 2007 (19). Los niveles de resistencia a los ITIAN y los ITINAN que se detectaron en la investigación actual son superiores a los que detectaron Choi, J. Y. y cols. en un estudio en Corea del Sur en el 2014. Sin embargo, la frecuencia de la resistencia a los IP fue similar en ambas investigaciones (280). Además, tanto la resistencia múltiple a los ARV como la individual por medicamentos que se observaron en esta investigación son superiores a las que informaron Memarnejadian, A. y cols. en el año 2019 en un estudio realizado en Irán. Los autores observaron valores elevados de resistencia a los ITIAN e ITINAN, pero bajos a los IP. Atribuyeron estos resultados a la amplia utilización de los ITIAN+ITINAN pero resaltan que el empleo de los IP es reciente en ese país (281). Los niveles elevados de resistencia detectados en la investigación actual son superiores a los que observaron Assoumou, L. y cols en un estudio nacional realizado en Francia en el año 2013. Los autores relacionan sus resultados con el empleo de medicamentos ARVs con barrera genética alta (282). Un meta-análisis realizado a partir de investigaciones desarrolladas en China evidenció niveles elevados de resistencia a los ITIAN, ITINAN y a los IP. Se plantea por los autores del estudio, que la causa de tales resultados puede ser el extenso empleo en ese país de ARVs con barrera genética baja (283).

De manera general, la resistencia que se observó en este estudio es alta para los ITIAN, los ITINAN y los IP. Sin embargo, este análisis mostró una tendencia significativa a la disminución en el tiempo de la RCC a los ITIAN, los IP y la RMA. Esto pudiera ser consecuencia de la selección de los pacientes para la prueba de resistencia. En los primeros años de la aplicación de los ensayos genotípicos de resistencia en Cuba, se seleccionaron pacientes con fallo a varios regímenes de terapia con mayor prioridad. Sin embargo, después del año 2011 se aplicaron a pacientes que iniciaban la TARVAE o a todos los que

tenían fallo al primer régimen de tratamiento. Esto pudo hacer que los niveles de resistencia detectados en los primeros años de la aplicación de ensayos genotípicos de resistencia fueran mayores. La disminución de la resistencia también pudiera reflejar el mejor manejo clínico de los pacientes que reciben la TARVAE. Además, puede ser consecuencia de la mayor experiencia de los virólogos en la interpretación de los ensayos genotípicos de resistencia, lo que resulta en un aumento de la efectividad de la TARVAE (165).

La disminución de la resistencia que se observó en el presente estudio está en concordancia con la tendencia que se informa en los años recientes en los países desarrollados del Occidente de Europa y de América del Norte. Vercauteren y cols. en el año 2013, realizaron un estudio en Portugal, en el cual observaron que la resistencia múltiple a los ARVs disminuyó significativamente en ese periodo (266). Franzetti y cols. en el 2014 observaron que las mutaciones asociadas con la resistencia a los ITIAN, ITINAN y a los IP disminuyeron significativamente ($p<0,001$) en Italia entre los años 2003 y 2012 (284). Schmidt y cols. en el 2014 estudiaron muestras de una cohorte en Alemania para estimar la tendencia de la resistencia transmitida y adquirida entre esos años. Como resultado observaron que la prevalencia de la resistencia adquirida entre los pacientes tratados fue relativamente baja. Sin embargo, informaron una disminución significativa ($p<0,001$) de la resistencia a los ARVs entre los años 2001 y 2011 (285).

Aldous y cols. en el año 2017 estudiaron la resistencia adquirida y la tendencia de la misma en Washington, Estados Unidos, entre los años 1994 y 2014 y observaron que el 40,5% de los pacientes estudiados presentaban resistencia adquirida a la TARVAE. Sin embargo, también observaron una disminución significativa de la resistencia adquirida a los ITIAN entre los años 2008 y 2013 ($p = 0,0004$) (286). Rocheleau y cols. estudiaron la tendencia de la resistencia del VIH-1 a la TARVAE en una cohorte en Canadá y observaron que la resistencia adquirida disminuyó de un 39% (51/132) al 3% (8/322, $p <0,0001$) . Este estudio a diferencia del presente involucró un número mayor de pacientes y se realizó durante casi veinte años (287).

### IV.2.6. Distribución de las mutaciones de resistencia entre los diferentes subtipos.

Como se observa en la tabla 12, la mutación K65R de resistencia a los ITIAN fue significativamente más frecuente ($p=0,001$; OR: 10,733; 95% IC: 3,303 – 34,873) en muestras de individuos tratados con 3TC e infectados con VIH-1 del subtipo C (n=34).

Además, entre los pacientes bajo tratamiento con AZT o d4T, infectados con la forma recombinante compleja de origen cubano FRC19_cpx (n=19) se observó la mutación L210W (n=15) con una frecuencia mayor (p=0,007; OR: 2,479; 95% IC: 1,260 – 4,878). La mutación K101E (n=3) que confiere resistencia a los ITINAN se observó con mayor frecuencia (p=0,037; OR: 6,636; 95% IC: 1,285 – 34,267) en individuos tratados con NVP e infectados con el subtipo C (n=6). Finalmente, la mutación I47V/I (n=4), de resistencia a los IP, se detectó con mayor frecuencia (p=0,029, OR: 6,4, 95% 95% IC: 1,338 – 30,606) en individuos tratados con LPV/r infectados con formas recombinantes FRC_BG (n=10).

Tabla 12: Mutaciones de resistencia en las variantes genéticas detectadas en los pacientes que no responden al tratamiento.

| Subtipo (n) | TARVAE | Mutación (n) | Valor de p* | OR (IC 95%) |
|---|---|---|---|---|
| | | ITIAN | | |
| **C (34)** | 3TC | K65R (5) | 0,001 | 10,733 (3,303–34,873) |
| **FRC 19_cpx (68)** | AZT o d4T | L210W (15) | 0,007 | 2,479 (1,260–4,878) |
| | | ITINAN | | |
| **C (6)** | NVP | K101E (3) | 0,037 | 6,636 (1,285–34,267) |
| | | IP | | |
| **FRC(20,23,24)_BG (10)** | LPV/r | I47V (4) | 0,029 | 6,4 (1,338–30,606) |

N: número de muestras. ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, ITINAN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos, IP: inhibidores de la proteasa, OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de confianza, Valor de p*: Prueba de chi cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates.

Actualmente, la susceptibilidad de los diferentes subtipos del VIH-1 a los medicamentos ARVs es objeto de mucha atención. Sin embargo, a nivel mundial son escasos los datos de secuenciación de la PR y la RT de los subtipos no-B, por lo tanto, se recomienda una mayor investigación sobre este tema.

En el presente estudio, el hallazgo de que la mutación K65R se detectó más frecuentemente en individuos infectados con el subtipo C del VIH-1 es consistente con estudios previos (288-292). Brenner y cols. en el año 2006, informaron que las variantes virales del subtipo C desarrollan rápidamente la mutación K65R, que confiere resistencia al TDF y recomiendan utilizar con mucho cuidado los regímenes de TARVAE con este ARV (292). En el año 2006, Doualla-Bell y cols. analizaron los genotipos de la transcriptasa inversa de muestras de virus del subtipo C y observaron que en los pacientes infectados con este subtipo se incrementa la probabilidad de tener la mutación K65R (289). Estos autores, en otro estudio, sugirieron que las variantes virales del subtipo C que circulan en Bostwana

desarrollaron resistencia mediante mecanismos específicos del subtipo viral (290). Posteriormente, Coutsinos y cols. en el año 2009, propusieron que la selección de la mutación K65R se producía mediante un mecanismo dependiente de la secuencia nucleotídica de los codones 64, 65 y 66 del subtipo C (291).

Theys y cols. en el año 2013, publicaron una investigación en la que compararon la prevalencia de la mutación K65R en muestras de virus de los subtipos A, B, C, F, G y FRC02_AG, obtenidas de individuos expuestos a una TARVAE que incluía el TDF. Ese estudio concluyó que la selección de la mutación K65R fue significativamente mayor en muestras de individuos infectados con el subtipo C del VIH-1 que recibieron tratamiento con un esquema de TARVAE que incluía TDF (293). Sin embargo, la selección de esta mutación también pone en riesgo la terapia con todos los ITIAN excepto el AZT, si se tiene en cuenta que esta mutación también induce resistencia cruzada a todos los ITIANs (126). Skosana y cols. en el año 2015 informaron una prevalencia alta de la mutación K65R en los pacientes infectados con el subtipo C del VIH-1 que estaban fallando a los regímenes de terapia de primera línea basados en TDF. Los autores señalan que su trabajo demuestra que la frecuencia de la mutación K65R es mayor en los pacientes sudafricanos infectados con el subtipo C al compararlos con países en los que no predomina el subtipo C (288).

La mutación L210W se observó en una frecuencia significativamente mayor en individuos infectados con la forma recombinante compleja de origen cubano FRC19_cpx que estaban bajo la presión selectiva del tratamiento con AZT o d4T. Esto tiene implicaciones importantes en la aplicación de los regímenes de TARVAE basados en los ITIAN en Cuba. Es importante resaltar que la forma recombinante FRC19_cpx es la segunda variante genética que se observó con más frecuencia en estudios previos de la epidemia cubana de VIH-1 (15, 206). Una investigación publicada por Machado y cols. acerca de ese tema en el año 2012, informó un incremento significativo (p=0,016) en la proporción de las FRC19_cpx (206) comparado con una investigación previa de Pérez y cols. en el 2006 (15). En el año 2015, Blanco y cols. estudiaron la variabilidad genética del VIH en Cuba, a partir de los resultados obtenidos al secuenciar los tres genes mayores del virus (*gag*, *pol* y *env*), obteniendo resultados diferentes de los informados anteriormente. En su estudio, observaron que la mitad de las muestras eran del subtipo B del VIH-1. Sin embargo, solo el

3,9%, el 2,0% y el 1,7% de las muestras pertenecían a las formas recombinantes FRC19_cpx, FRC(20,23,24)_BG y FRC18_cpx, respectivamente (294).

Kourí y cols. en el año 2015, informaron que la forma recombinante FRC19_cpx es una variante evolutiva del VIH-1 que se asocia fuertemente con la progresión rápida a SIDA en Cuba (16). Este descubrimiento confirma la importancia de la vigilancia de la variabilidad genética del VIH y de su posible relación con la clínica y la patogenia de esta enfermedad.

Resulta interesante que la mutación K101E se haya observado con mayor frecuencia en los individuos infectados con el subtipo C que se encontraban recibiendo tratamiento con NVP. Es necesario resaltar que la emergencia de esta mutación es suficiente para desarrollar resistencia a terapias que contengan RPV (126). Rimsky y cols. observaron que, al determinar el genotipo de las muestras obtenidas en los ensayos clínicos ECHO y TRIVE la sensibilidad del VIH-1 a la RPV disminuía 2,4 veces en presencia de la mutación K101E (276). Este hallazgo pudiera indicar que el tratamiento con NVP a los individuos infectados con el subtipo C, afecta el empleo futuro de la RPV como tratamiento de rescate en estos pacientes. Imposibilitando así el uso de esta droga de la clase ITINAN de última generación.

La frecuencia más elevada de la mutación I47V en los individuos infectados con las formas recombinantes FRC(20,23,24)_BG representa una desventaja para el empleo de las terapias basadas en IP en Cuba. Esta mutación, afecta negativamente los regímenes de TARVAE que contengan DRV/r o LPV/r, debido a que su presencia es suficiente para producir resistencia a estos medicamentos (126). La mutación I47V, se considera una mutación mayor o principal para la resistencia a los medicamentos antes mencionadas, esto se debe a que su presencia se asoció con la respuesta virológica disminuida a estos ARVs (126). En el año 2008, Descamps y cols. identificaron el efecto negativo de esta mutación en la respuesta virológica al DRV/r al estudiar las mutaciones asociadas con la respuesta virológica al DRV/r en individuos tratados con inhibidores de proteasa (295).

Cada vez existe más evidencia de que la mutación I47V se asocia con la resistencia de alto grado al LPV/r. Friend, J y cols. en el año 2004 informaron que esta mutación se seleccionaba después de 12 meses bajo tratamiento con LPV/r, produciéndose un aumento en la carga viral. El ensayo fenotípico posterior reveló un aumento de 38 veces la resistencia (296). Shafer y cols., en el año 2008, comentaron que esta mutación produce

resistencia baja o intermedia al resto de los IP excepto al ATV y al SQV, aunque confiere alto nivel de resistencia al DRV/r y al LPV/r (297).

La forma recombinante compleja FRC19_cpx y las FRC(20,23,24)_BG circulan casi exclusivamente en Cuba (13, 14, 20). Por tanto, se requieren estudios posteriores para confirmar estos hallazgos.

# V. DISCUSIÓN GENERAL

## V. DISCUSIÓN GENERAL.

Actualmente, las investigaciones internacionales persiguen un objetivo ambicioso pero posible: poner fin a la epidemia de SIDA antes del año 2030. Para lograr este objetivo, la OMS se propuso la Estrategia 90-90-90, con la cual se logrará que más del 72,9% de las personas que viven con VIH en todo el mundo tengan supresión viral gracias a la TARVAE, lo que hará más difícil la transmisión del virus (147). La causa principal del fracaso de la TARVAE es la presencia de variantes resistentes, lo que impide que se logre la supresión viral en los individuos que la reciben. Para que la TARVAE sea óptima es necesaria la vigilancia de la resistencia pre-tratamiento y la resistencia adquirida, mediante la realización de las pruebas de resistencia (143, 147, 148).

Antes de la presente investigación, no era posible realizar los ensayos genotípicos de resistencia en Cuba, y las investigaciones cubanas sobre este tema se desarrollaban en laboratorios fuera de Cuba. El ensayo genotípico de resistencia que se implementó en este estudio permite guiar de manera efectiva la terapia del paciente, fortalece la vigilancia de la resistencia a los ARVs y tiene una gran influencia en las estrategias de tratamiento para lograr que la TARVAE sea óptima en Cuba (162). Contar con este ensayo genotípico es imprescindible para lograr la supresión viral en el 90% de las personas bajo TARVAE, lo cual es fundamental para alcanzar los objetivos de la estrategia 90-90-90 (119). Además permite abordar los objetivos de trabajo del Plan de Acción Global y los del Plan Estratégico Nacional para la Prevención y el Control de las ITS, el VIH y las Hepatitis, 2019-2023.

La epidemia de VIH-1 en Cuba se caracteriza por una prevalencia baja (0,4%) que contrasta con una diversidad genética elevada y con la circulación de varios subtipos, sub-subtipos, FRC y FRU (Registro Nacional de VIH 2020, Ministerio de Salud, Cuba). El ensayo in-house determinó el genotipo de muestras clínicas de casi todos los subtipos del grupo M, varias FRC y FRU, por lo que puede emplearse para el seguimiento clínico eficiente de los pacientes con fallo a la TARVAE en entornos de alta diversidad genética. El estudio de este tema en nuestro país es muy necesario por el impacto negativo que puede tener en la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico, en el diseño de las vacunas y medicamentos ARVs, así como en la precisión de los ensayos genotípicos de resistencia. También es útil para recabar información relacionada con la vigilancia de la emergencia y

la transmisión de las variantes de VIH resistentes a los ARVs en países con una epidemia de VIH de alta variabilidad genética.

En el presente estudio los subtipos no-B del VIH-1 fueron los más prevalentes, lo cual concuerda con la alta diversidad genética del VIH-1 en Cuba, que se demostró en estudios previos (19, 205), y contrasta con la alta proporción de subtipo B en el Caribe (235, 236). Se plantea que la expansión de las diferentes formas recombinantes pudo deberse a los patrones de conducta sexual y a los hábitos tóxicos predominantes. Además, debe considerarse la posibilidad de una mayor adecuación evolutiva debido a una mayor capacidad de replicación y eficiencia de transmisión, que pudieran representar una ventaja evolutiva (15). Kourí y cols. en el año 2015, encontraron que la FRC19_cpx presenta una alta adecuación evolutiva y plantearon que esta pudiera ser la causa de la frecuencia elevada de la progresión rápida a SIDA en los pacientes con infección reciente en Cuba lo que confirmó la importancia de la vigilancia de la variabilidad genética del VIH-1 en Cuba (16).

La susceptibilidad de los diferentes subtipos del VIH-1 a los medicamentos ARVs es objeto de mucha atención. Sin embargo, en todo el mundo son escasos los datos de secuenciación de la PR y la RT de los subtipos no-B, por lo tanto, se recomienda una mayor investigación sobre este tema.

En Cuba se han realizado grandes avances en la disminución de la morbilidad y la mortalidad relacionada con el VIH mediante el acceso universal y gratuito a la TARVAE. Debido a las circunstancias económicas en Cuba, las combinaciones de medicamentos más comunes para la primera y segunda línea de TARVAE al momento de realizarse este estudio se reducían a seis ARVs genéricos de producción nacional. Por tanto, un número sustancial de pacientes con fallo virológico pudieran haberse tratado con regímenes terapéuticos sub-óptimos durante periodos de tiempo prolongados. De ese modo, su evolución clínica pudo afectarse por la aparición de la resistencia del VIH-1 a los medicamentos ARVs.

En el presente estudio se observó una frecuencia de mutaciones de resistencia en individuos no tratados superior a la que se encontró en los estudios previos realizados en Cuba (19, 237) y en los países del Caribe, México y América Central (156, 258-264). Además, la frecuencia alta de mutaciones de resistencia a los ITIAN, ITINAN e IP, que se detectó en

los pacientes tratados, evidenció la falta de potencia de las combinaciones de medicamentos empleados en la TARVAE en el momento de realizar el presente estudio.

La mutación L210W se observó en una frecuencia significativamente mayor en los individuos infectados con la forma recombinante compleja de origen cubano FRC19_cpx que estaban bajo la presión selectiva del tratamiento con AZT o d4T. La forma recombinante FRC19_cpx es la segunda variante genética que con mayor frecuencia se observó en los estudios previos de la epidemia cubana de VIH-1 (15, 206). Además, recientemente un estudio realizado por Kourí y cols. informó que la forma recombinante FRC19_cpx es una variante evolutiva del VIH-1 que se asocia con la progresión rápida a SIDA en Cuba (16). Esto pudiera influir negativamente en la aplicación de los regímenes de TARVAE basados en los ITIAN en Cuba y en la evolución clínica de los pacientes infectados con la FRC19_cpx.

Es interesante que la mutación K101E se haya observado con mayor frecuencia en los individuos infectados con el subtipo C que se encontraban recibiendo tratamiento con NVP. La emergencia de esta mutación es suficiente para desarrollar resistencia a las terapias que contengan RPV (126). Este hallazgo pudiera indicar que el tratamiento con NVP a los individuos infectados con el subtipo C afecta el empleo futuro de la RPV como tratamiento de rescate en estos pacientes. Lo que afecta el uso de este medicamento de la clase ITINAN de última generación.

Finalmente, la frecuencia más elevada de la mutación I47V en individuos infectados con las formas recombinantes FRC(20,23,24)_BG puede ser una desventaja para el empleo de las terapias basadas en IP en Cuba. Principalmente pone en peligro los regímenes de TARVAE que contengan DRV/r o LPV/r, debido a que la presencia de esta mutación es suficiente para producir resistencia alta a estos medicamentos (126). La forma recombinante compleja FRC19_cpx y las FRC(20,23,24)_BG son de origen cubano y circulan casi exclusivamente en Cuba (13, 14). Por tanto, se requieren estudios posteriores para confirmar estos hallazgos.

De manera general la resistencia que se observó en este estudio es alta para los ITIAN, los ITINAN y los IP. Sin embargo, este análisis mostró una tendencia significativa a la disminución en el tiempo de la RCC para los ITIAN, los IP y la RMA. La disminución significativa de la resistencia a los medicamentos en Cuba pudiera ser una consecuencia de

la selección de los pacientes para la prueba de resistencia. En los primeros años de la aplicación de la prueba, se seleccionaron con mayor prioridad muestras de pacientes con fallo a varios regímenes de terapia. Sin embargo, después del año 2011 se aplicaron las pruebas de resistencia genotípica a pacientes que iniciaban la terapia o a todos los que tenían fallo al primer régimen de tratamiento. La disminución de la resistencia también pudiera estar reflejando el mejor manejo clínico de la TARVAE basándose en los resultados del ensayo in-house. Otro factor pudo ser la mayor experiencia de los médicos y los virólogos en la interpretación de los ensayos genotípicos de resistencia, lo que resulta en un aumento de la efectividad de la TARVAE (165).

# CONCLUSIONES

**CONCLUSIONES.**

- Se demostró que el ensayo genotípico in-house evaluado en este estudio es exacto y aplicable a la determinación de los subtipos y formas recombinantes más frecuentes en Cuba, así como las mutaciones asociadas a la resistencia a los antirretrovirales.
- Se confirmó la alta diversidad genética del VIH-1 en Cuba y se comprueba el incremento de la circulación de las formas recombinantes de origen cubano.
- La frecuencia alta de las mutaciones de resistencia en los individuos no tratados y en los pacientes bajo TARVAE, evidenció la necesidad de realizar ensayos genotípicos de resistencia a los ARVs antes de iniciar o cambiar la TARVAE.
- La disminución de la resistencia a los ARVs en el tiempo en el presente estudio, demostró un mejor manejo clínico de la TARVAE y una selección adecuada de los casos, así como la mayor experiencia de los médicos y los virólogos para la interpretación de los ensayos genotípicos de resistencia.
- La infección con algunas variantes genéticas recombinantes de origen cubano y la exposición a múltiples regímenes de TARVAE se relacionaron con la frecuencia de las mutaciones de resistencia del VIH-1 en Cuba.

# RECOMENDACIONES

## RECOMENDACIONES

- Participar en un programa externo de evaluación de la calidad de los ensayos genotípicos de resistencia del VIH a los ARVs.
- Realizar estudios del genoma completo de las variantes genéticas de VIH más frecuentes en Cuba para profundizar en el conocimiento de su relación con los niveles y perfiles de resistencia a los antirretrovirales.
- Realizar estudios fenotípicos que permitan profundizar en la patogenia de los recombinantes cubanos del VIH-1 (FRC18_cpx, FRC19_cpx, FRC 20,23,24_BG).

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.


1. Knipe D, Howley P. Fields Virology. Sixth edition ed. David M. Knipe P, Peter M. Howley M, editors2013.
2. Global AIDS Update. 2020 [2nd Edition.:[Available from: https://aidsinfo.unaids.org/.
3. Zidovudine (AZT). Lancet. 1987;1(8539):957-8.
4. Friedland G. FDA approves d4T as alternative to AZT, ddI, or ddC. Food and Drug Administration. AIDS clinical care. 1995;7(1):4, 10.
5. Carpenter CC, Cooper DA, Fischl MA, Gatell JM, Gazzard BG, Hammer SM, et al. Antiretroviral therapy in adults: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. JAMA : the journal of the American Medical Association. 2000;283(3):381-90.
6. Hoffman C. HIV Medicine 2005 2005. Available from: www.HIVMedicine.com.
7. Richman DD. Zidovudine resistance of human immunodeficiency virus. Reviews of infectious diseases. 1990;12 Suppl 5:S507-10; discussion S10-2.
8. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 Antiretroviral Resistance: Scientific Principles and Clinical Applications. Drugs. 2012;72(9):e1-e25.
9. Bennett DE, Myatt M, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. Antiviral therapy. 2008;13 Suppl 2:25-36.
10. Perez J, Perez D, Gonzalez I, Diaz Jidy M, Orta M, Aragones C, et al. Approaches to the management of HIV-AIDS in Cuba. 2004.
11. Thomson MM, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. AIDS reviews. 2005;7(4):210-24.
12. Delatorre E, Bello G. Phylodynamics of the HIV-1 Epidemic in Cuba. PloS one. 2013;8(9).
13. Casado G, Thomson MM, Sierra M, Najera R. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19_cpx) in Cuba. J Acquir Immune Defic Syndr. 2005;40(5):532-7.
14. Sierra M, Thomson MM, Posada D, Perez L, Aragones C, Gonzalez 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.
15. Perez L, Thomson MM, Bleda MJ, Aragones C, Gonzalez Z, Perez 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.
16. 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.
17. Santoro MM, Perno CF. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. ISRN microbiology. 2013;2013:481314.
18. Ruibal I, Diaz HM, de Armas MB, Noa E. On HIV genetic diversity in Cuba. AIDS (London, England). 2003;17(15):2274-5; author reply 5-6.
19. Perez L, Alvarez LP, Carmona R, Aragones C, Delgado E, Thomson MM, et al. Genotypic resistance to antiretroviral drugs in patients infected with several HIV type 1 genetic forms in Cuba. AIDS research and human retroviruses. 2007;23(3):407-14.
20. Thomson MM, Casado G, Posada D, Sierra M, Najera R. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba. AIDS. 2005;19(11):1155-63.
21. Cuevas MT, Ruibal I, Villahermosa ML, Diaz H, Delgado E, Parga EV, et al. High HIV-1 genetic diversity in Cuba. AIDS (London, England). 2002;16(12):1643-53.

22. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science (New York, NY). 1983;220(4599):865-7.
23. Schäfer G, Hoffmann C, Arasteh K, Schürmann D, Stephan C, Jensen B, et al. Immediate versus deferred antiretroviral therapy in HIV-infected patients presenting with acute AIDS-defining events (toxoplasmosis, Pneumocystis jirovecii-pneumonia): a prospective, randomized, open-label multicenter study (IDEAL-study). AIDS research and therapy. 2019;16.
24. Ebner L, Walti LN, Rauch A, Furrer H, Cusini A, Meyer AMJ, et al. Clinical Course, Radiological Manifestations, and Outcome of Pneumocystis jirovecii Pneumonia in HIV Patients and Renal Transplant Recipients. PloS one. 2016;11(11).
25. Nissapatorn V. Toxoplasma gondii and HIV: a never-ending story. The lancet HIV. 2017;4(4):e146-e7.
26. Freed EO, Martin MA. Human Immunodeficiency Viruses: Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. II. 5th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. p. 1502-60.
27. CDC. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. . MMWR Morbidity and mortality weekly report. 1981;30(21):250-2.
28. Joncas JH, Delage G, Chad Z, Lapointe N. Acquired (or congenital) immunodeficiency syndrome in infants born of Haitian mothers. The New England journal of medicine. 1983;308(14):842.
29. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science (New York, NY). 1983;220(4599):868-71.
30. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science (New York, NY). 1984;224(4648):500-3.
31. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science (New York, NY). 1984;224(4648):497-500.
32. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. Science (New York, NY). 1995;267(5197):483-9.
33. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet 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.
34. Roques P, Robertson DL, Souquiere S, Apetrei C, Nerrienet E, Barre-Sinoussi F, et al. Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. AIDS (London, England). 2004;18(10):1371-81.
35. 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.
36. 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.
37. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, et al. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. Science (New York, NY). 2014;346(6205):56-61.
38. 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.
39. 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.

40. Freed EO, Gale M, Jr. Antiviral innate immunity: editorial overview. Journal of molecular biology. 2014;426(6):1129-32.
41. Speck RF, Wehrly K, Platt EJ, Atchison RE, Charo IF, Kabat D, et al. Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. Journal of virology. 1997;71(9):7136-9.
42. Zhang Z, He M, Bai S, Zhang F, Jiang J, Zheng Q, et al. T = 4 Icosahedral HIV-1 Capsid As an Immunogenic Vector for HIV-1 V3 Loop Epitope Display. Viruses. 2018;10(12).
43. 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.
44. 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.
45. Haseltine WA, Wong-Staal F. The molecular biology of the AIDS virus. Scientific American. 1988;259(4):52-62.
46. Saag M, Gibbons J, al. e. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo. Nature. 1988;334:440–4.
47. Dampier W, Nonnemacher MR, Mell J, Earl J, Ehrlich GD, Pirrone V, et al. HIV-1 Genetic Variation Resulting in the Development of New Quasispecies Continues to Be Encountered in the Peripheral Blood of Well-Suppressed Patients. PloS one. 2016;11(5).
48. Yeo JY, Goh GR, Su CTT, Gan SKE. The Determination of HIV-1 RT Mutation Rate, Its Possible Allosteric Effects, and Its Implications on Drug Resistance. Viruses. 2020;12(3).
49. Starcich B, Shaw G, al. e. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. Cell. 1986;45:637–48.
50. 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.
51. Holland JJ, De La Torre JC, Steinhauer DA. RNA virus populations as quasispecies. Current topics in microbiology and immunology. 1992;176:1-20.
52. Domingo E, Mas A, Yuste E, Pariente N, Sierra S, Gutierrez-Riva M, et al. Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update. Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques. 2001;57:77-115.
53. Virgilio MC, Collins KL, Feldman C. The Impact of Cellular Proliferation on the HIV-1 Reservoir
Potential Impact of SARS-CoV-2 Infection in HIV-positive Patients in South Africa. Viruses. 2020;12(2):19-24.
54. Brooks K, Jones BR, Dilernia DA, Wilkins DJ, Claiborne DT, McInally S, et al. HIV-1 variants are archived throughout infection and persist in the reservoir. PLoS pathogens. 2020;16(6).
55. Suzuki Y. [HIV pathogenesis and intrinsic cellular defense mechanisms]. Nippon rinsho Japanese journal of clinical medicine. 2010;68(3):415-21.
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, Djemai M, Lemee V, Reggiani A, Leoz M, Burc L, et al. Census and analysis of persistent false-negative results in serological diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 group O infections. Journal of clinical microbiology. 2009;47(9):2906-11.
58. Taylor BS, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. The New England journal of medicine. 2008;359(18):1965-6.
59. Patiño-Galindo J, González-Candelas F. The substitution rate of HIV-1 subtypes: a genomic approach. Virus evolution. 2017;3(2).
60. Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. Journal of virology. 1989;63(3):1455-9.

61. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999). 2002;29(2):184-90.
62. Reis MNG, Guimarães ML, Bello G, Stefani MMA. Identification of New HIV-1 Circulating Recombinant Forms CRF81_cpx and CRF99_BF1 in Central Western Brazil and of Unique BF1 Recombinant Forms. Frontiers in microbiology. 2019;10.
63. Reis MG, Bello G, Guimarães ML, Stefani MMA. Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions. PloS one. 2017;12(6).
64. AL DM, Rigatto MH. Epidemiology of transmitted drug resistance mutations in an HIV-1 subtype C high-prevalence setting and impact on 1-year virological failure. Journal of global antimicrobial resistance. 2019;20:33-5.
65. Gartner MJ, Roche M, Churchill MJ, Gorry PR, Flynn JK. Understanding the mechanisms driving the spread of subtype C HIV-1. EBioMedicine. 2020;53.
66. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. AIDS (London, England). 2011;25(5):679-89.
67. Kantor. PACaR. Transmitted drug resistance in nonsubtype B HIV-1 infection
Published in final edited form as:
HIV Ther. 2009:447–65.
68. Peeters M, Sharp PM. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. AIDS (London, England). 2000;14 Suppl 3:S129-40.
69. Hoffmann C, Rockstroh J. HIV 2012/2013. 2012.
70. Grande F, Occhiuzzi MA, Rizzuti B, Ioele G, De Luca M, Tucci P, et al. CCR5/CXCR4 Dual Antagonism for the Improvement of HIV Infection Therapy. Molecules (Basel, Switzerland). 2019;24(3).
71. Ronsard L, Sood V, Yousif AS, Ramesh J, Shankar V, Das J, et al. Genetic Polymorphisms in the Open Reading Frame of the CCR5 gene From HIV-1 Seronegative and Seropositive Individuals From National Capital Regions of India. Scientific reports. 2019;9.
72. B B, PO B, JM B, HE V. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. Genes & development. 1989;3(4):469-78.
73. PO B, HE V, al. e. Correct integration of retroviral DNA in vitro. . Cell Adhesion & Migration. 1987;49:347–56.
74. PO B, B B, HE V, JM B. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989;96(8):2525-9.
75. MK FT. Retroviral DNA integration: Structure of an integration intermediate. Cell. 1988;54:497–504.
76. Bernacchi S, Abd El-Wahab EW, Dubois N, Hijnen M, Smyth RP, Mak J, et al. HIV-1 Pr55Gag binds genomic and spliced RNAs with different affinity and stoichiometry. RNA biology. 2017;14(1):90-103.
77. 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.
78. EM F, M-ML, F C, al. e. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. Journal of virology. 1988;62:4414–9.
79. 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.

80. 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.
81. 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.
82. Hecht FM, Grant RM, Petropoulos CJ, Dillon B, Chesney MA, Tian H, et al. Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. The New England journal of medicine. 1998;339(5):307-11.
83. Fauci AS PG, Stanley S, et al. Immunopathogenic mechanisms of HIV reproduction. Annals of internal medicine. 1996;124:654.
84. Freed EO, Martin MA. Fields Virology 2013.
85. 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.
86. Ho DD. Therapy of HIV infections: problems and prospects. Bulletin of the New York Academy of Medicine. 1996;73(1):37-45.
87. CDC CfDCaP. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 1992;41:1–19.
88. 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.
89. Matuszewski S, Hermisson J, Kopp M. Catch Me if You Can: Adaptation from Standing Genetic Variation to a Moving Phenotypic Optimum. Genetics. 2015;200(4):1255-74.
90. Direción Nacional de Epidemiología iaM. In: VIH/sida, editor. 2015.
91. Kourí V, Alemán Y, Díaz D, Pérez L, Limia CM, Soto Y, et al. Co-Receptor Tropism Determined by Genotypic Assay in HIV-1 Circulating in Cuba. Journal of AIDS & clinical research. 2016;7(592).
92. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2012;2(4).
93. Yuan D, Liu M, Jia P, Li Y, Huang Y, Ye L, et al. Prevalence and determinants of virological failure, genetic diversity and drug resistance among people living with HIV in a minority area in China: a population-based study
Impacts of drug resistance mutations on the structural asymmetry of the HIV-2 protease. BMC infectious diseases. 2020;20.
94. Cutrell J, Jodlowski T, Bedimo R. The management of treatment-experienced HIV patients (including virologic failure and switches). Therapeutic advances in infectious disease. 2020;7.
95. Volberding PA, Lagakos SW, Koch MA, Pettinelli C, Myers MW, Booth DK, et al. Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. The AIDS Clinical Trials Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. The New England journal of medicine. 1990;322(14):941-9.
96. Fischl MA, Richman DD, Hansen N, Collier AC, Carey JT, Para MF, et al. The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection. A double-blind, placebo-controlled trial. The AIDS Clinical Trials Group. Annals of internal medicine. 1990;112(10):727-37.

97. Hammer SM, Yeni P. Antiretroviral therapy: where are we? AIDS (London, England). 1998;12 Suppl A:S181-8.
98. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH, et al. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. The New England journal of medicine. 1996;335(15):1081-90.
99. Cameron DW, Heath-Chiozzi M, Danner S, Cohen C, Kravcik S, Maurath C, et al. Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group. Lancet. 1998;351(9102):543-9.
100. Conan K. Woods CJB, Tommy F. Liu, Celia K. S. Chui, Anna L. Chu, Brian Wynhoven, Tom A. Hall, Christina Trevino, Robert W. Shafer and P. Richard Harrigana. Automating HIV Drug Resistance Genotyping with RECall, a Freely Accessible Sequence Analysis Tool. Journal of clinical microbiology. 2012;50:1936–42.
101. Kitayimbwa JM, Mugisha JY, Saenz RA. Estimation of the HIV-1 backward mutation rate from transmitted drug-resistant strains. Theoretical population biology. 2016;112:33-42.
102. De Feo C, Weiss C. Escape from Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Entry Inhibitors. Viruses. 2012;4:3859-911.
103. Lobritz MA, Ratcliff AN, Arts EJ. HIV-1 Entry, Inhibitors, and Resistance. Viruses. 2010;2(5):1069-105.
104. Wheeler DA, Lalezari JP, Kilby JM, Wheat J, Delehanty J, DeMasi R, et al. Safety, tolerability, and plasma pharmacokinetics of high-strength formulations of enfuvirtide (T-20) in treatment-experienced HIV-1-infected patients. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2004;30(2):183-90.
105. Walmsley S. Individualized therapy for the treatment-experienced patient. The AIDS reader. 2003;13(6 Suppl):S11-5.
106. Alkhatib G. The biology of CCR5 and CXCR4. Current opinion in HIV and AIDS. 2009;4(2):96-103.
107. Wilkin T, Gulick R. CCR5 Antagonism in HIV Infection: Current Concepts and Future Opportunities. Annual review of medicine. 2012;63:81–93.
108. Grobler JA, Stillmock K, Hu B, Witmer M, Felock P, Espeseth AS, et al. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(10):6661-6.
109. Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, Grobler JA, et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. Science (New York, NY). 2000;287(5453):646-50.
110. Orta-Resendiz A, Rodriguez-Diaz RA, Angulo-Medina LA, Hernandez-Flores M, Soto-Ramirez LE. HIV-1 acquired drug resistance to integrase inhibitors in a cohort of antiretroviral therapy multi-experienced Mexican patients failing to raltegravir: a cross-sectional study. AIDS research and therapy. 2020;17.
111. Marinello J, Marchand C, Mott BT, Bain A, Thomas CJ, Pommier Y. Comparison of raltegravir and elvitegravir on HIV-1 integrase catalytic reactions and on a series of drug-resistant integrase mutants. Biochemistry. 2008;47(36):9345-54.
112. Marchand C, Maddali K, Metifiot M, Pommier Y. HIV-1 IN inhibitors: 2010 update and perspectives. Current topics in medicinal chemistry. 2009;9(11):1016-37.
113. Zamora FJ, Dowers E, Yasin F, Ogbuagu O. Dolutegravir And Lamivudine Combination For The Treatment Of HIV-1 Infection. HIV/AIDS (Auckland, NZ). 2019;11:255-63.

114. Yoshinaga T, Miki S, Kawauchi-Miki S, Seki T, Fujiwara T. Barrier to Resistance of Dolutegravir in Two-Drug Combinations. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2019;63(3).
115. Wainberg MA, Han YS, Mesplede T. Might dolutegravir be part of a functional cure for HIV? Canadian journal of microbiology. 2016;62(5):375-82.
116. Semengue ENJ, Santoro MM, Ndze VN, Dambaya B, Takou D, Teto G, et al. HIV-1 integrase resistance associated mutations and the use of dolutegravir in Sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis protocol. Systematic reviews. 2020;9.
117. Sax PE, DeJesus E, Crofoot G, Ward D, Benson P, Dretler R, et al. Bictegravir versus dolutegravir, each with emtricitabine and tenofovir alafenamide, for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 2 trial. The lancet HIV. 2017;4(4):e154-e60.
118. Zeuli J, Rizza S, Bhatia R, Temesgen Z. Bictegravir, a novel integrase inhibitor for the treatment of HIV infection. Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998). 2019;55(11):669-82.
119. Hauser A, Hofmann A, Meixenberger K, Altmann B, Hanke K, Bremer V, et al. Increasing proportions of HIV-1 non-B subtypes and of NNRTI resistance between 2013 and 2016 in Germany: Results from the national molecular surveillance of new HIV-diagnoses. PloS one. 2018;13(11).
120. Afani A, Gallardo A. Resistencia a la terapia antiretroviral en la infección por virus de inmunodefi ciencia humana. Rev Chil Infect. 2011;28(5):461-9.
121. Condra JH, Schleif WA, Blahy OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, et al. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. Nature. 1995;374(6522):569-71.
122. Larder BA. Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. The Journal of general virology. 1994;75 ( Pt 5):951-7.
123. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. Annual review of microbiology. 1997;51:151-78.
124. Zuo L, Liu K, Liu H, Hu Y, Zhang Z, Qin J, et al. Trend of HIV-1 drug resistance in China: A systematic review and meta-analysis of data accumulated over 17 years (2001–2017). EClinicalMedicine. 2020;18.
125. Lira R, Valdez-Salazar H, Vazquez-Rosales G, Rojas-Montes O, Ruiz-Tachiquin M, Torres-Ibarra R, et al. Genotypic testing for HIV-1 drug resistance using dried blood samples. Archives of virology. 2010;155(7):1117-25.
126. Wensing AM, Calvez V, Ceccherini-Silberstein F, Charpentier C, Günthard HF, Paredes R, et al. 2019 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. Topics in antiviral medicine. 2019;27(3):111-21.
127. 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).
128. Domingo E, Menendez-Arias L, Holland JJ. RNA virus fitness. Reviews in medical virology. 1997;7(2):87-96.
129. Lobritz M, Ratcliff A, Marozsan A, Dudley D, Tilton J, Artsb E. Multifaceted Mechanisms of HIV Inhibition and Resistance to CCR5 Inhibitors PSC-RANTES and Maraviroc. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013;57(6):2640–50.
130. Delgado R. [Mechanisms of resistance and failure of treatment with maraviroc]. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. 2008;26 Suppl 11:28-33.
131. Zhuang M, Vassell R, Yuan C, Keller PW, 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(11).

132. Luu Q, Dean J, Diem Do T, Carr M, 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(00).
133. Wu E, Du Y, Gao X, Zhang J, Martin J, Mitreva M, et al. V1 and V2 Domains of HIV Envelope Contribute to CCR5 Antagonist Resistance. Journal of virology. 2019;93(9).
134. Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, et al. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. The New England journal of medicine. 2008;359(14):1429-41.
135. 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).
136. 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.
137. 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.
138. 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.
139. Moreno S, Berenguer J. [Efficacy of dolutegravir in treatment-experienced patients: the SAILING and VIKING trials]. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. 2015;33 Suppl 1:26-30.
140. Cahn P, Pozniak AL, Mingrone H, Shuldyakov A, Brites C, Andrade-Villanueva JF, et al. Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naive adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. Lancet. 2013;382(9893):700-8.
141. Zhou HY, Zheng YH, He Y, Chen Z, He B. The role of autophagy in THP-1 macrophages resistance to HIV- vpr-induced apoptosis. Experimental cell research. 2017;351(1):68-73.
142. Zuo L, Peng K, Hu Y, Xu Q. Genotypic Methods for HIV Drug Resistance Monitoring: The Opportunities and Challenges Faced by China. Current HIV research. 2019;17(4):225-39.
143. Organization. WH. Global action plan on HIV drug resistance 2017-2021 Geneva2017 [License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO]. Available from: https://apps.who.int/iris/handle/10665/255883.
144. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. The New England journal of medicine. 2016;375(9):830-9.
145. Effect of immediate initiation of antiretroviral treatment on the risk of acquired HIV drug resistance. AIDS (London, England). 2018;32(3):327-35.
146. . !!! INVALID CITATION !!! .
147. Bertagnolio S, Beanland RL, Jordan MR, Doherty M, Hirnschall AG. The World Health Organization's Response to Emerging Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance and a Call for Global Action. The Journal of infectious diseases. 2017.
148. Sundareshan V, Koirala J. Preexposure Prophylaxis for HIV Prevention. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
StatPearls Publishing LLC.; 2019.

149. Baeten JM, Donnell D, Ndase P, Mugo NR, Campbell JD, Wangisi J, et al. Antiretroviral Prophylaxis for HIV Prevention in Heterosexual Men and Women. The New England journal of medicine. 2012.
150. 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. 2019;393(10189):2428-38.
151. Palumbo PJ, Fogel JM, Hudelson SE, Wilson EA, Hart S, Hovind L, et al. HIV drug resistance in adults receiving early versus delayed antiretroviral therapy: HPTN 052. Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999). 2018;77(5):484-91.
152. Van Laethem K, Schrooten Y, Dedecker S, Van Heeswijck L, Deforche K, Van Wijngaerden E, et al. A genotypic assay for the amplification and sequencing of gag and protease from diverse human immunodeficiency virus type 1 group M subtypes. Journal of virological methods. 2006;132(1-2):181-6.
153. Pineda-Pena AC, Faria NR, Imbrechts S, Libin P, Abecasis AB, Deforche K, et al. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2013;19:337-48.
154. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution. 2011;28(10):2731-9.
155. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype Recombination. Journal of virology. 1999;73(1):152-60.
156. 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).
157. Lemey P, Derdelinckx I, Rambaut A, Van Laethem K, Dumont S, Vermeulen S, et al. Molecular Footprint of Drug-Selective Pressure in a Human Immunodeficiency Virus Transmission Chain†. Journal of virology. 2005;79(18):11981-9.
158. A S. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics (Oxford, England). 2006;22:2688–90.
159. Jennings L VDV, Gulley ML. College of American Pathologists Molecular Pathology Resource Committee (2009) Recommendend principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. Ach Pathol Lab Med.133:743–55.
160. Adolescents. HPoAGfAa. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf.2014 [updated Accessed 27 May 2014.
161. Vandamme AM, Camacho RJ, Ceccherini-Silberstein F, de Luca A, Palmisano L, Paraskevis D, et al. European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing: 2011 update. AIDS reviews. 2011;13(2):77-108.
162. Chaturbhuj DN, Nirmalkar AP, Paranjape RS, Tripathy SP. Evaluation of a Cost Effective In-House Method for HIV-1 Drug Resistance Genotyping Using Plasma Samples. PloS one. 2014;9(2).
163. Parkin N, de Mendoza C, Schuurman R, Jennings C, Bremer J, Jordan MR, et al. Evaluation of In-house Genotyping Assay Performance Using Dried Blood Spot Specimens in the Global World

Health Organization Laboratory Network. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2012;54(Suppl 4):S273-9.
164. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular biology and evolution. 2013;30(12):2725-9.
165. Vercauteren J, Deforche K, Theys K, Debruyne M, Duque LM, Peres S, et al. The incidence of multidrug and full class resistance in HIV-1 infected patients is decreasing over time (2001-2006) in Portugal. Retrovirology. 2008;5:12.
166. Aragones C, Campos JR, Perez D, Martinez A, Perez J. SIDATRAT: informatics to improve HIV/AIDS care. MEDICC review. 2012;14(4):5-9.
167. Hervada Vidal X SPM, Vázquez Fernández E, Castillo Salgado C, Loyola Elizondo E, Silva Ayçaguer LC. . Epidat 3.0: programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. Rev Esp Salud Pública. 2004;78:277–80.
168. Gonzalez-Serna A, Min JE, Woods C, Chan D, Lima VD, Montaner JS, et al. Performance of HIV-1 drug resistance testing at low-level viremia and its ability to predict future virologic outcomes and viral evolution in treatment-naive individuals. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2014;58(8):1165-73.
169. Aitken SC, Kliphuis A, Wallis CL, Chu ML, Fillekes Q, Barth R, et al. Development and evaluation of an assay for HIV-1 protease and reverse transcriptase drug resistance genotyping of all major group-M subtypes. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2012;54(1):21-5.
170. Chew KK, Ng KY, Khong WX, Kaur P, Yap JK, Chua A, et al. Clinical evaluation of an in-house human immunodeficiency virus (HIV) genotyping assay for the detection of drug resistance mutations in HIV-1 infected patients in Singapore. Annals of the Academy of Medicine, Singapore. 2012;41(12):553-8.
171. Chaturbhuj DN, Deshmukh PS, Hingankar NK, Siddhaarth K, Deshpande SN, al. e. Evaluations of an in-house drug resistance method for HIV-1 drug resistance using ViroSeq 2.0 Genotyping System as a gold standard. Journal of virological methods. 2013;1:87–92.
172. Inzaule S, Yang C, Kasembeli A, Nafisa L, Okonji J, Oyaro B, et al. Field evaluation of a broadly sensitive HIV-1 in-house genotyping assay for use with both plasma and dried blood spot specimens in a resource-limited country. Journal of clinical microbiology. 2013;51(2):529-39.
173. WHO. WHO/HIVResNet HIV Drug Resistance Laboratory Strategy. http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hiv_reslab_strategy.pdf.2010 [
174. Aitken SC, Bronze M, Wallis CL, Stuyver L, Steegen K, Balinda S, et al. A Pragmatic Approach to HIV-1 Drug Resistance Determination in Resource-Limited Settings by Use of a Novel Genotyping Assay Targeting the Reverse Transcriptase-Encoding Region Only. Journal of clinical microbiology. 2013;51(6):1757-61.
175. Chaturbhuj DN, Deshmukh PS, Hingankar NK, Siddhaarth K, Deshpande SN, Sen S, et al. Evaluations of an in-house drug resistance method for HIV-1 drug resistance using ViroSeq 2.0 genotyping system as a gold standard. Journal of virological methods. 2013;189(1):87-92.
176. Chen JH, Wong KH, Li PC, Chan KK, Lee MP, To SW, et al. In-house human immunodeficiency virus-1 genotype resistance testing to determine highly active antiretroviral therapy resistance mutations in Hong Kong. Hong Kong Med J. 2012;18(1):20-4.
177. Fokam J, Salpini R, Santoro MM, Cento V, D'Arrigo R, Gori C, et al. Performance evaluation of an in-house human immunodeficiency virus type-1 protease-reverse transcriptase genotyping assay in Cameroon. Archives of virology. 2011;156(7):1235-43.
178. Monleau M, Aghokeng AF, Eymard-Duvernay S, Dagnra A, Kania D, Ngo-Giang-Huong N, et al. Field evaluation of dried blood spots for routine HIV-1 viral load and drug resistance monitoring

in patients receiving antiretroviral therapy in Africa and Asia. Journal of clinical microbiology. 2014;52(2):578-86.
179. Saravanan S, Vidya M, Balakrishanan P, Kumarasamy N, Solomon SS, Solomon S, et al. Evaluation of two human immunodeficiency virus-1 genotyping systems: ViroSeq(TM) 2.0 and an in-house method. Journal of virological methods. 2009;159(2):211-6.
180. Wallis CL, Papathanasopoulos MA, Lakhi S, Karita E, Kamali A, Kaleebu P, et al. Affordable in-house antiretroviral drug resistance assay with good performance in non-subtype B HIV-1. Journal of virological methods. 2010;163(2):505-8.
181. Chen JH, Wong KH, Chan K, Lam HY, Lee SS, Li P, et al. Evaluation of an in-house genotyping resistance test for HIV-1 drug resistance interpretation and genotyping. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2007;39(2):125-31.
182. Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Chia JE, Edoul EM, Delaporte E, Peeters M. High failure rate of the ViroSeq HIV-1 genotyping system for drug resistance testing in Cameroon, a country with broad HIV-1 genetic diversity. Journal of clinical microbiology. 2011;49(4):1635-41.
183. Beddows S, Galpin S, Kazmi SH, Ashraf A, Johargy A, al. e. Performance of two commercially available sequence-based HIV-1 genotyping systems for the detection of drug resistance against HIV type 1 group M subtypes. Journal of medical virology. 2003;70:337–42.
184. Thiam M, Diop-Ndiaye H, Kebe K, Vidal N, R D-L, al. e. Performance of the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 on HIV-1 strains circulating in Senegal. J Virol Methods PMID: 15109820. 2013;188:97–103.
185. Bile EC, Adje-Toure C, Borget MY, Kalou M, Diomande F, Chorba T, et al. Performance of drug-resistance genotypic assays among HIV-1 infected patients with predominantly CRF02_AG strains of HIV-1 in Abidjan, Cote d'Ivoire. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2005;32(1):60-6.
186. Eshleman SH, Hackett J, Swanson P, Cunningham SP, Drews B, Brennan C, et al. Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for Sequence-Based Analysis of Diverse Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains. Journal of clinical microbiology. 2004;42(6):2711-7.
187. Jagodzinski LL, Cooley JD, Weber M, Michael NL. Performance characteristics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping systems in sequence-based analysis of subtypes other than HIV-1 subtype B. Journal of clinical microbiology. 2003;41(3):998-1003.
188. Mracna M, Becker-Pergola G, Dileanis J, Guay LA, Cunningham S, Jackson JB, et al. Performance of Applied Biosystems ViroSeq HIV-1 Genotyping System for Sequence-Based Analysis of Non-Subtype B Human Immunodeficiency Virus Type 1 from Uganda. Journal of clinical microbiology. 2001;39(12):4323-7.
189. Huang DD, Eshleman SH, Brambilla DJ, Palumbo PE, Bremer JW. Evaluation of the editing process in human immunodeficiency virus type 1 genotyping. Journal of clinical microbiology. 2003;41(7):3265-72.
190. Woods CK, Brumme CJ, Liu TF, Chui CK, Chu AL, 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.
191. WHO. HIV drug resistance laboratory training package, 2009: HIV Genotyping Assay Validation. 2009 [Available from: http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/HIVDR_Mod_7_Assay_Validation.ppt.
192. Zhou Z, Wagar N, DeVos JR, Rottinghaus E, Diallo K, Nguyen DB, et al. Optimization of a Low Cost and Broadly Sensitive Genotyping Assay for HIV-1 Drug Resistance Surveillance and Monitoring in Resource-Limited Settings. PloS one. 2011;6(11).

193. Acharya A, Vaniawala S, Shah P, Misra RN, Wani M, Mukhopadhyaya PN. Development, validation and clinical evaluation of a low cost in-house HIV-1 drug resistance genotyping assay for Indian patients. PloS one. 2014;9(8):e105790.
194. Anejo-Okopi JA, Onywera H, Abah IO, Ebonyi AO, Agbaji OO, Agaba AP, et al. Utility of a Relatively Affordable In-House HIV-1 Genotyping Assay for Drug Resistance Testing among Non B HIV-1 Infected Drug Naive Patients in Nigeria. Advances in Microbiology. 2018;8:355-65.
195. Chimukangara B, Varyani B, Shamu T, Mutsvangwa J, Manasa J, White E, et al. HIV drug resistance testing among patients failing second line antiretroviral therapy. Comparison of in-house and commercial sequencing. Journal of virological methods. 2017;243:151-7.
196. Delong AK, Wu M, Bennett D, Parkin N, Wu Z, Hogan JW, et al. Sequence quality analysis tool for HIV type 1 protease and reverse transcriptase. AIDS research and human retroviruses. 2012;28(8):894-901.
197. Li H, Liang S, Guo W, Zhuang D, Li L, Liu Y, et al. Comparison between an in-house method and the ViroSeq method for determining mutations for drug resistance in the HIV-1 CRF01_AE subtype circulating in China. Journal of virological methods. 2014;205c:17-23.
198. Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S, Shafer RW. HIV-1 drug resistance and resistance testing. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2016.
199. Shafer RW, Jung DR, Betts BJ. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and protease mutation search engine for queries. Nature medicine. 2000;6(11):1290-2.
200. Rhee SY, Sankaran K, Varghese V, Winters MA, Hurt CB, Eron JJ, et al. HIV-1 Protease, Reverse Transcriptase, and Integrase Variation. Journal of virology. 2016;90(13):6058-70.
201. Audu R, Onwuamah C, Okpokwu J, Imade G, Odaibo G, Okwuraiwe A, et al. Genotyping performance evaluation of commercially available HIV-1 drug resistance test. PloS one. 2018.
202. Hauser A, Meixenberger K, Machnowska P, Fiedler S, Hanke K, Hofmann A, et al. Robust and sensitive subtype-generic HIV-1 pol genotyping for use with dried serum spots in epidemiological studies. J Virol Methods PMID: 15109820. 2018.
203. Manasa J, Danaviah S, Pillay S, Padayachee P, Mthiyane H, Mkhize C, et al. An affordable HIV-1 drug resistance monitoring method for resource limited settings. Journal of visualized experiments : JoVE. 2014(85).
204. Aragones C, Sanchez L, Campos JR, Perez J. Antiretroviral therapy adherence in persons with HIV/AIDS in Cuba. MEDICC review. 2011;13(2):17-23.
205. Machado LY, Dubed M, Diaz H, Ruiz N, Romay D, Valdes N, et al. Transmitted HIV type 1 drug resistance in newly diagnosed Cuban patients. AIDS research and human retroviruses. 2013;29(2):411-4.
206. 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.
207. Volberding PA, Deeks SG. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. Lancet. 2010;376(9734):49-62.
208. Hatano H, Hunt P, Weidler J, Coakley E, Hoh R, Liegler T, et al. Rate of viral evolution and risk of losing future drug options in heavily pretreated, HIV-infected patients who continue to receive a stable, partially suppressive treatment regimen. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2006;43(10):1329-36.
209. Hammer SM, Eron JJ, Jr., Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. JAMA : the journal of the American Medical Association. 2008;300(5):555-70.

210. Clumeck N, Pozniak A, Raffi F. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults. HIV medicine. 2008;9(2):65-71.
211. Holodniy M. HIV-1 load quantitation: a 17-year perspective. The Journal of infectious diseases. 2006;194 Suppl 1:S38-44.
212. de Mendoza C, Rodriguez C, Colomina J, Tuset C, Garcia F, Eiros JM, et al. Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of HIV type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2005;41(9):1350-4.
213. de Mendoza C, Rodriguez C, Eiros JM, Colomina J, Garcia F, Leiva P, et al. Antiretroviral recommendations may influence the rate of transmission of drug-resistant HIV type 1. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2005;41(2):227-32.
214. Montaner J, Guimaraes D, Chung J, Gafoor Z, Salgo M, DeMasi R. Prognostic staging of extensively pretreated patients with advanced HIV-1 disease. HIV clinical trials. 2005;6(6):281-90.
215. Gupta RK, Hill A, Sawyer AW, Cozzi-Lepri A, von Wyl V, Yerly S, et al. Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis. The Lancet infectious diseases. 2009;9(7):409-17.
216. Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. Science (New York, NY). 1996;272(5265):1167-70.
217. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. Science (New York, NY). 1997;278(5342):1447-50.
218. Altfeld M, Rosenberg ES, Shankarappa R, Mukherjee JS, Hecht FM, Eldridge RL, et al. Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. The Journal of experimental medicine. 2001;193(2):169-80.
219. Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, Mui SK, Addo MM, Johnston MN, et al. Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. The Journal of experimental medicine. 2004;200(6):701-12.
220. Thigpen MC, Kebaabetswe PM, Paxton LA, Smith DK, Rose CE, Segolodi TM, et al. Antiretroviral Preexposure Prophylaxis for Heterosexual HIV Transmission in Botswana. The New England journal of medicine. 2012.
221. Machado LY, Blanco M, Lopez LS, Diaz HM, Dubed M, Valdes N, et al. National survey of pre-treatment HIV drug resistance in Cuban patients. PloS one. 2019;14(9):e0221879.
222. O'Brien W. Resistance to antiretroviral drugs. BETA bulletin of experimental treatments for AIDS : a publication of the San Francisco AIDS foundation. 1998:11-4, 63.
223. Chang HE. Antiretroviral treatment progress reports from a European conference. BETA bulletin of experimental treatments for AIDS : a publication of the San Francisco AIDS foundation. 1995:10-2.
224. Geretti AM. Clinical implications of HIV drug resistance to nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitors. AIDS reviews. 2006;8(4):210-20.
225. Bossi P, Peytavin G, Ait-Mohand H, Delaugerre C, Ktorza N, Paris L, et al. GENOPHAR: a randomized study of plasma drug measurements in association with genotypic resistance testing and expert advice to optimize therapy in patients failing antiretroviral therapy. HIV medicine. 2004;5(5):352-9.

226. Afani SA, Gallardo OA. [Antiretroviral resistance in human immunodeficiency virus infection]. Revista chilena de infectologia : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia. 2011;28(5):461-9.
227. Afani SA, Orellana RL, Duarte JP, Acevedo MW, Morales BO, Wolff RM, et al. [Resistance to anti-retroviral therapy in Chilean patients with HIV-1 from 2002 to 2005]. Revista medica de Chile. 2007;135(10):1237-44.
228. Rangel HR, Garzaro DJ, Torres JR, Castro J, Suarez JA, Naranjo L, et al. Prevalence of antiretroviral drug resistance among treatment-naive and treated HIV-infected patients in Venezuela. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;104(3):522-5.
229. Deshpande A, Jauvin V, Magnin N, Pinson P, Faure M, Masquelier B, et al. Resistance mutations in subtype C HIV type 1 isolates from Indian patients of Mumbai receiving NRTIs plus NNRTIs and experiencing a treatment failure: resistance to ARVs. AIDS Research and Human Retroviruses. 2007;23(2):335-40.
230. de Mendoza C, Garrido C, Corral A, Ramirez-Olivencia G, Jimenez-Nacher I, Zahonero N, et al. Changing rates and patterns of drug resistance mutations in antiretroviral-experienced HIV-infected patients. AIDS research and human retroviruses. 2007;23(7):879-85.
231. Bertagnolio S, De Luca A, Vitoria M, Essajee S, Penazzato M, Hong SY, et al. Determinants of HIV drug resistance and public health implications in low- and middle-income countries. Antiviral therapy. 2012;17(6):941-53.
232. Perrin L, Kaiser L, Yerly S. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. The Lancet infectious diseases. 2003;3(1):22-7.
233. Butler IF, Pandrea I, Marx PA, Apetrei C. HIV genetic diversity: biological and public health consequences. Current HIV research. 2007;5(1):23-45.
234. Clutter DS, Rojas Sanchez P, Rhee SY, Shafer RW. Genetic Variability of HIV-1 for Drug Resistance Assay Development. Viruses. 2016;8(2).
235. Nadai Y, Eyzaguirre LM, Sill A, Cleghorn F, Nolte C, Charurat M, et al. HIV-1 epidemic in the Caribbean is dominated by subtype B. PloS one. 2009;4(3):e4814.
236. Vaughan HE, Cane P, Pillay D, Tedder RS. Characterization of HIV type 1 clades in the Caribbean using pol gene sequences. AIDS research and human retroviruses. 2003;19(10):929-32.
237. Ruibal-Brunet IJ, Cuevas MT, Diaz-Torres H, Villahermosa ML, Noa-Romero E, Vazquez de Parga E, et al. Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in HIV-1 B and non-B subtypes from Cuba. Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health. 2001;10(3):174-80.
238. Perez L, Correa C, Campos YA, Gonzalez I, Perez J, Martinez PA, et al. Drug-resistant HIV-1 in Cuban children and their seropositive mothers. MEDICC review. 2011;13(2):24-31.
239. Takebe Y, Motomura K, Tatsumi M, Lwin HH, Zaw M, Kusagawa S. High prevalence of diverse forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. AIDS (London, England). 2003;17(14):2077-87.
240. Yang R, Xia X, Kusagawa S, Zhang C, Ben K, Takebe Y. On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in the Yunnan Province of China. AIDS (London, England). 2002;16(10):1401-7.
241. Dowling WE, Kim B, Mason CJ, Wasunna KM, Alam U, Elson L, et al. Forty-one near full-length HIV-1 sequences from Kenya reveal an epidemic of subtype A and A-containing recombinants. AIDS (London, England). 2002;16(13):1809-20.
242. Harris ME, Serwadda D, Sewankambo N, Kim B, Kigozi G, Kiwanuka N, et al. Among 46 near full length HIV type 1 genome sequences from Rakai District, Uganda, subtype D and AD recombinants predominate. AIDS research and human retroviruses. 2002;18(17):1281-90.

243. Thomson MM, Delgado E, Herrero I, Villahermosa ML, Vazquez-de Parga E, Cuevas MT, et al. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. The Journal of general virology. 2002;83(Pt 1):107-19.
244. Sierra M, Thomson MM, Rios M, Casado G, Castro RO, Delgado E, et al. The analysis of near full-length genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Chile, Venezuela and Spain reveals their relationship to diverse lineages of recombinant viruses related to CRF12_BF. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2005;5(3):209-17.
245. Thomson MM, Sierra M, Tanuri A, May S, Casado G, Manjon N, et al. Analysis of near full-length genome sequences of HIV type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Brazil reveals their independent origins and their lack of relationship to CRF12_BF. AIDS research and human retroviruses. 2004;20(10):1126-33.
246. Aulicino PC, Holmes EC, Rocco C, Mangano A, Sen L. Extremely rapid spread of human immunodeficiency virus type 1 BF recombinants in Argentina. Journal of virology. 2007;81(1):427-9.
247. Holguin A, de Mulder M, Yebra G, Lopez M, Soriano V. Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. Current HIV research. 2008;6(4):327-34.
248. Foster GM, Ambrose JC, Hue S, Delpech VC, Fearnhill E, Abecasis AB, et al. Novel HIV-1 recombinants spreading across multiple risk groups in the United Kingdom: the identification and phylogeography of Circulating Recombinant Form (CRF) 50_A1D. PloS one. 2014;9(1):e83337.
249. Church D, Gregson D, Lloyd T, Klein M, Beckthold B, Laupland K, et al. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0, Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections. Journal of clinical microbiology. 2011;49(1):118-24.
250. von Truchsess I, Harris B, Schatzl HM, Hackett J, Jr. The first B/G intersubtype recombinant form of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) identified in Germany was undetected or underquantitated by some commercial viral load assays. Journal of medical virology. 2006;78(3):311-7.
251. Holguin A, Lopez M, Molinero M, Soriano V. Performance of three commercial viral load assays, Versant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, testing HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants. Journal of clinical microbiology. 2008;46(9):2918-23.
252. Pérez L, Vélez S, Díaz HM, Pintos Y, Machado LY, Kourí V, et al. Comparison of NucliSens® EasyQ® HIV-1 v2.0 and COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 HIV-1 v2.0 commercial systems for the determination of viral load of different HIV-1 genetic variants in Cuban patients. Biotecnología Aplicada. 2019;36(3):3221-6.
253. Machado LF, Ishak MO, Vallinoto AC, Lemos JA, Azevedo VN, Moreira MR, et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. AIDS research and human retroviruses. 2009;25(10):961-6.
254. Rios M, Delgado E, Perez-Alvarez L, Fernandez J, Galvez P, de Parga EV, et al. Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. Journal of medical virology. 2007;79(6):647-56.
255. Pando MA, Gomez-Carrillo M, Vignoles M, Rubio AE, dos Ramos Farias MS, Vila M, et al. Incidence of HIV type 1 infection, antiretroviral drug resistance, and molecular characterization in

newly diagnosed individuals in Argentina: A Global Fund Project. AIDS research and human retroviruses. 2011;27(1):17-23.
256. Delgado E, Rios M, Fernandez J, Perez-Alvarez L, Najera R, Thomson MM. Identification of a new HIV type 1 BF intersubtype circulating recombinant form (CRF44_BF) in Chile. AIDS research and human retroviruses. 2010;26(7):821-6.
257. Guimaraes 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.
258. Myers JE, Taylor BS, Rojas Fermin RA, Reyes EV, Vaughan C, Jose L, et al. Transmitted Drug Resistance Among Antiretroviral-Naive Patients with Established HIV Type 1 Infection in Santo Domingo, Dominican Republic and Review of the Latin American and Caribbean Literature. AIDS research and human retroviruses. 2012;28(7):667-74.
259. Barrow GJ, Hylton-Kong T, Rodriguez N, Figueroa JP. HIV-1 drug resistance in treatment-naive, chronically infected patients in Jamaica. Antiviral therapy. 2013.
260. Escoto-Delgadillo M, Torres-Mendoza BM, Flores-Soto M, Vazquez-Valls E. HIV drug resistance in antiretroviral-naive patients in Mexico after 10 years: Is there a difference? AIDS research and human retroviruses. 2016.
261. Avila-Rios S, Garcia-Morales C, Garrido-Rodriguez D, Tapia-Trejo D, Giron-Callejas AC, Mendizabal-Burastero R, et al. HIV-1 drug resistance surveillance in antiretroviral treatment-naive individuals from a reference hospital in Guatemala, 2010-2013. AIDS research and human retroviruses. 2015;31(4):401-11.
262. Holguin A, Yebra G, Martin L, de Pineda AT, Ruiz LE, Quezada AY, et al. Transmitted drug-resistance in human immunodeficiency virus-infected adult population in El Salvador, Central America. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2013;19(12):E523-32.
263. Avila-Rios S, Garcia-Morales C, Tapia-Trejo D, Meza RI, Nunez SM, Parham L, et al. HIV Drug Resistance Surveillance in Honduras after a Decade of Widespread Antiretroviral Therapy. PloS one. 2015;10(11):e0142604.
264. Mendoza Y, Castillo Mewa J, Martinez AA, Zaldivar Y, Sosa N, Arteaga G, et al. HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance Mutations in Treatment Naive and Experienced Panamanian Subjects: Impact on National Use of EFV-Based Schemes. PloS one. 2016;11(4):e0154317.
265. WHO. Surveillance of HIV drug resistance in populations initiating antiretroviral therapy (pre-treatment HIV drug resistance). 2014.
266. Vercauteren J, Theys K, Carvalho AP, Valadas E, Duque LM, Teofilo E, et al. The demise of multidrug-resistant HIV-1: the national time trend in Portugal. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2013;68(4):911-4.
267. Schuurman R, Nijhuis M, van Leeuwen R, Schipper P, de Jong D, Collis P, et al. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). The Journal of infectious diseases. 1995;171(6):1411-9.
268. Picard V, Angelini E, Maillard A, Race E, Clavel F, Chene G, et al. Comparison of genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with stavudine and didanosine or zidovudine and lamivudine. The Journal of infectious diseases. 2001;184(6):781-4.
269. Larder BA, Darby G, Richman DD. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. Science (New York, NY). 1989;243(4899):1731-4.
270. Bacheler LT, Anton ED, Kudish P, Baker D, Bunville J, Krakowski K, et al. Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2000;44(9):2475-84.

271. Richman DD, Havlir D, Corbeil J, Looney D, Ignacio C, Spector SA, et al. Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus type 1 selected during therapy. Journal of virology. 1994;68(3):1660-6.
272. Jones LR, Moretti F, Calvo AY, Dilernia DA, Manrique JM, Gomez-Carrillo M, et al. Drug Resistance Mutations in HIV pol Sequences from Argentinean Patients Under Antiretroviral Treatment: Subtype, Gender, and Age Issues. AIDS research and human retroviruses. 2012;28(8):949-55.
273. Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J, de Bethune MP, Kraus G, Boven K, et al. TMC278, a Next-Generation Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI), Active against Wild-Type and NNRTI-Resistant HIV-1 ▿ †. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(2):718-27.
274. Molina JM, Cahn P, Grinsztejn B, Lazzarin A, Mills A, Saag M, et al. Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naive adults infected with HIV-1 (ECHO): a phase 3 randomised double-blind active-controlled trial. Lancet. 2011;378(9787):238-46.
275. Cohen CJ, Andrade-Villanueva J, Clotet B, Fourie J, Johnson MA, Ruxrungtham K, et al. Rilpivirine versus efavirenz with two background nucleoside or nucleotide reverse transcriptase inhibitors in treatment-naive adults infected with HIV-1 (THRIVE): a phase 3, randomised, non-inferiority trial. Lancet. 2011;378(9787):229-37.
276. Rimsky L, Vingerhoets J, Van Eygen V, Eron J, Clotet B, Hoogstoel A, et al. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 isolates obtained from patients on rilpivirine therapy experiencing virologic failure in the phase 3 ECHO and THRIVE studies: 48-week analysis. Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999). 2012;59(1):39-46.
277. Melikian GL, Rhee SY, Varghese V, Porter D, White K, Taylor J, et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2014;69(1):12-20.
278. Reuman EC, Rhee SY, Holmes SP, Shafer RW. Constrained patterns of covariation and clustering of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2010;65(7):1477-85.
279. Shahriar R, Rhee SY, Liu TF, Fessel WJ, Scarsella A, Towner W, et al. Nonpolymorphic human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase treatment-selected mutations. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;53(11):4869-78.
280. Choi JY, Kwon OK, Choi BS, Kee MK, Park M, Kim SS. The prevalence of antiretroviral multidrug resistance in highly active antiretroviral therapy-treated patients with HIV/AIDS between 2004 and 2009 in South Korea. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2014;60(2):154-60.
281. Memarnejadian A, Nikpoor AR, Davoodian N, Kargar A, Mirzadeh Y, Gouklani H. HIV-1 Drug Resistance Mutations among Antiretroviral Drug-Experienced Patients in the South of Iran. Intervirology. 2019;62(2):72-9.
282. Assoumou L, Charpentier C, Recordon-Pinson P, Grude M, Pallier C, Morand-Joubert L, et al. Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients with viral load >50 copies/mL: a 2014 French nationwide study. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2017;72(6):1769-73.
283. Wu J, Norris J, Liu HX, Li Z, Su YY, Zhu L, et al. The Prevalence of HIV Drug Resistance among Treatment-failure Individuals and Treatment-naive Individuals in China: A Meta-analysis. Biomedical and environmental sciences : BES. 2014;27(11):858-71.
284. Franzetti M, Violin M, Antinori A, De Luca A, Ceccherini-Silberstein F, Gianotti N, et al. Trends and correlates of HIV-1 resistance among subjects failing an antiretroviral treatment over the 2003-2012 decade in Italy. BMC infectious diseases. 2014;14:398.

285. Schmidt D, Kollan C, Fatkenheuer G, Schulter 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.
286. Aldous AM, Castel AD, Parenti DM. Prevalence and trends in transmitted and acquired antiretroviral drug resistance, Washington, DC, 1999-2014. BMC research notes. 2017;10(1):474.
287. Rocheleau G, Brumme CJ, Shoveller J, Lima VD, Harrigan PR. Longitudinal trends of HIV drug resistance in a large Canadian cohort, 1996-2016. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2017.
288. Skhosana L, Steegen K, Bronze M, Lukhwareni A, Letsoalo E, Papathanasopoulos MA, et al. High prevalence of the K65R mutation in HIV-1 subtype C infected patients failing tenofovir-based first-line regimens in South Africa. PloS one. 2015;10(2):e0118145.
289. Doualla-Bell F, Avalos A, Brenner B, Gaolathe T, Mine M, Gaseitsiwe S, et al. High prevalence of the K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates from infected patients in Botswana treated with didanosine-based regimens. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006;50(12):4182-5.
290. Doualla-Bell F, Avalos A, Gaolathe T, Mine M, Gaseitsiwe S, Ndwapi N, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtype C on drug resistance mutations in patients from Botswana failing a nelfinavir-containing regimen. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006;50(6):2210-3.
291. Coutsinos D, Invernizzi CF, Xu H, Moisi D, Oliveira M, Brenner BG, et al. Template usage is responsible for the preferential acquisition of the K65R reverse transcriptase mutation in subtype C variants of human immunodeficiency virus type 1. Journal of virology. 2009;83(4):2029-33.
292. Brenner BG, Oliveira M, Doualla-Bell F, Moisi DD, Ntemgwa M, Frankel F, et al. HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. AIDS (London, England). 2006;20(9):F9-13.
293. Theys K, Vercauteren J, Snoeck J, Zazzi M, Camacho RJ, Torti C, et al. HIV-1 subtype is an independent predictor of reverse transcriptase mutation K65R in HIV-1 patients treated with combination antiretroviral therapy including tenofovir. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013;57(2):1053-6.
294. Blanco M, Machado LY, Diaz 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.
295. Descamps D, Lambert-Niclot S, Marcelin AG, Peytavin G, Roquebert B, Katlama C, et al. Mutations associated with virological response to darunavir/ritonavir in HIV-1-infected protease inhibitor-experienced patients. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2009;63(3):585-92.
296. Friend J, Parkin N, Liegler T, Martin JN, Deeks SG. Isolated lopinavir resistance after virological rebound of a ritonavir/lopinavir-based regimen. AIDS (London, England). 2004;18(14):1965-6.
297. Shafer RW, Schapiro JM. HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. AIDS reviews. 2008;10(2):67-84.

# ANEXOS

## ANEXOS

### Anexo 1: Aval del Comité Ética

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL**
**"PEDRO KOURÍ"**
Ministerio de Salud Pública

**Centro Auspiciado por la UNESCO**
**Centro Colaborador de la OMS/OPS**

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica
y control biológico de vectores y huéspedes intermediarios
Para el estudio de las Enfermedades Víricas
En Tuberculosis y Micobacterias
Para el estudio del Dengue y su vector

INSTITUTO
PEDRO KOURÍ

**COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL**

**PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 08-12**

**"Vigilancia de la resistencia antirretroviral (ARV) y evolución molecular del VIH en Cuba"**

INVESTIGADORES PRINCIPALES

**Dra. Vivian Kourí Cardellá, DrC.**

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente a la presente circular por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

**DICTAMEN**

El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.

Dado, en el IPK, Ciudad de La Habana, a los 13 días del mes de agosto del año 2012

Dr Eric Martínez
Presidente

Lic. Iliana Valdés Hernández
Secretaria

Dra. Rayder Martínez
Vicepresidenta

Lic. Ana Margarita Montalvo

Dr. Carlos Fonseca

Teléfono (53 7) 202 0430 al 40 (pizarra) Teléfono (53 7) 202 0633; Fax (53 7) 204 6051 Telex: 51 1902 CUIPK Y 51 2341 CUIPK
E-mail: ciipk@ipk.sld.cu, Dirección: Autopista Novia del Mediodía Km. 6 ½, Ciudad Habana, Cuba, P.O. Box: 601 Marianao 13

**Anexo 2: Documento de consentimiento informado.**

Por medio de la presente solicitamos su colaboración, absolutamente voluntaria, para ser incluido en este proyecto. El Sistema Nacional de Salud Cubano, cuenta con una amplia cobertura en la atención integral al paciente seropositivo al VIH (Institutos, Hospitales, Sanatorios, etc). Sin embargo, a pesar de todas estas estrategias, se ha observado un creciente número de personas que son diagnosticadas cuando ya se encuentran en etapa sida, con una evolución muy rápida de su enfermedad, a pesar del tratamiento ARV, por esta razón, este estudio contribuirá a esclarecer la enfermedad y a identificar posibles marcadores que pudieran estar asociados a una rápida progresión a sida, con el objetivo de encontrar una respuesta que nos permita reducir la tendencia creciente de este fenómeno en nuestro país. El resultado de este trabajo contribuirá a elevar la calidad de vida de los pacientes VIH/SIDA, servirá de guía para el programa de lucha contra las enfermedades VIH/SIDA, pues permitirá predecir y en la medida de lo posible actuar a tiempo, en aquellos pacientes que presenten factores asociados con evolución rápida de la enfermedad, de acuerdo a los elementos científicos aportados. Para este estudio se necesitará una extracción de sangre, la que se realizará en presencia de monitoreo médico. La extracción de la sangre será realizada en el laboratorio clínico de nuestra Institución, por personal autorizado y con experiencia en ese menester, y cumpliendo todas las normas ética y de bioseguridad. La muestra de sangre obtenida para el estudio no será empleada para realizar ningún otro estudio ni prueba que no sea lo estrictamente estipulado en el presente proyecto.

Los resultados obtenidos serán estrictamente confidenciales, por lo que serán de dominio sólo de los autores del estudio y de los sujetos participantes.

Respetando los principios de voluntariedad, los participantes están en todo su derecho de decidir si desean o no colaborar con el estudio y una vez en el, puede solicitar su exclusión en cualquier etapa del mismo, si así lo deseara. Esa decisión será respetada y no conlleva a ninguna penalidad o pérdida de los beneficios, a los cuales tienen derecho. A cada uno de los participantes se le informará el resultado de sus estudios en las diferentes fases del proyecto hasta la conclusión final, y se les explicará el resultado si así lo desean. Los resultados de dichos estudios serán utilizados y publicados de forma anónima. De acuerdo con lo planteado en este documento, yo _____, estando en pleno

uso de mis facultades, accedo a colaborar con este proyecto. Del mismo modo certifico que participaré en dicho estudio de una forma absolutamente voluntaria, teniendo derecho a conocer los resultados del examen a mi realizado. Certifico por la presente que autorizo a las entidades sanitarias nacionales y/o extranjeras, al comité ético a que consulten los informes hospitalarios que posean mi nombre, sin que por ello pierdan su carácter confidencial.

Nombre y Apellidos del paciente y/o padre o tutor participante en el estudio:

_____ _____ _____ _____

Firma del paciente y/o padre o tutor participante en el estudio:

_____

Nombre y Apellidos del testigo:

_____ _____ _____ _____

Firma del testigo:

_____

Fecha: ___/_____/_____ (Día/Mes/Año)

Yo: _____ responsable del Protocolo de Investigación certifico por medio de la presente haberle explicado al paciente todo lo relacionado con este estudio e igualmente certifico que el mismo ha participado de forma absolutamente voluntaria en el ensayo.

Fecha: ___/_____/_____ (Día/Mes/Año) Firma_____

**Anexo 3: Modelo de recolección de información.**

I –Datos generales y variables sociodemográficas:

1. Historia Clínica: _____.
2. Fecha de diagnóstico de VIH: __/__/___.
3. Edad al diagnóstico de VIH: ___ Edad Actual___.
4. Sexo: ___.
5. Color de la piel: B__N__M__.
6. Nivel de escolaridad: ninguno__ primaria __ secundaria __ preuniversitaro o técnico medio __ superior __.

II-Variables epidemiológicas:

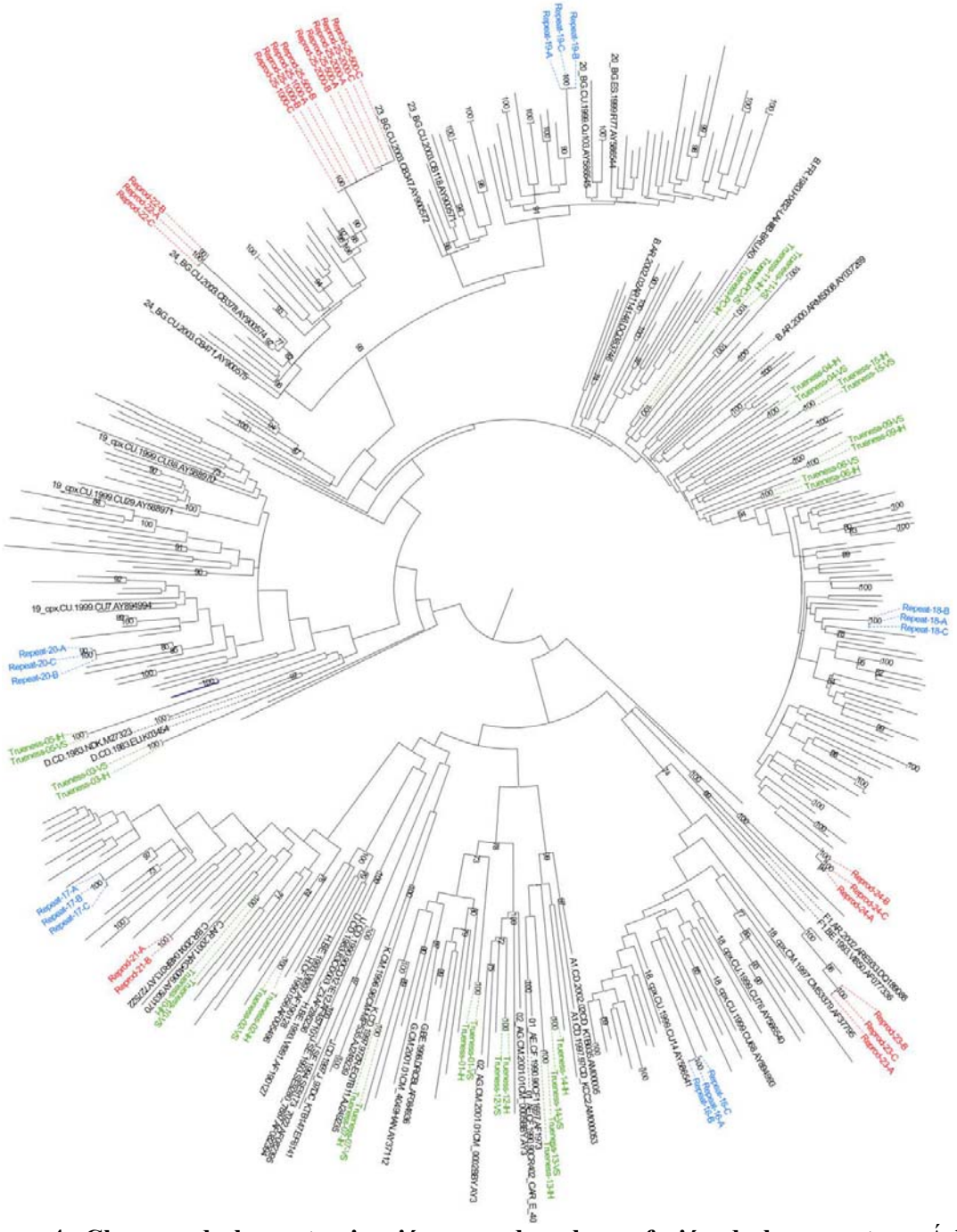
7. Forma de contagio: Sexual: __ Vaginal___ Anal___ Parenteral: __.
8. Conducta sexual:
    a. Número de parejas sexuales en el último año.____.
    b. ¿Mantiene relaciones sexuales paralelas con una o más personas o eventosfortuitos? Sí__ No__.
    c. Practica relaciones sexuales siempre con condón .Sí__ No__.
    d. Relaciones sexuales: Solo con personas del otro sexo__ solo con personas de su sexo __ambos __.
    e. Mantiene relaciones sexuales con otras personas seropositivas después del diagnostic de VIH: Sí: __No: ___.

III-Variables clínicas y de laboratorio:

9. Conteo de linfocitos T CD4 al diagnóstico de VIH: ____%_____ cel./mm³.
10. Valor de carga viral en el momento del diagnóstico de VIH: _____UI/ml.
11. Antecedentes de manifestaciones clínicas de síndrome retroviral agudo: Sí__ No__.
12. Causa definitoria de sida. Enfermedad oportunista . Cuál?_____.

Conteo de linfocitos TCD4 < 200_____Cuál____%_____ cel./mm³ CV _____.

13. Motivo por el cual se realizó serología para VIH anterior_____ y al diagnóstico_____.



**Anexo 4: Chequeo de la contaminación cruzada o la confusión de las muestras.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud, utilizando el modelo de evaluación de dos parámetros de Kimura. El soporte estadístico de los nodos se evaluó mediante re-muestreo (bootstrapping) empleando 1 000 réplicas. Se definió como grupo filogenético aquel que estuviera apoyado por un valor de bootstrap ≥70%. Exactitud: Trueness-IH y –VS: son las secuencias generadas por ambos ensayos, el ¨in-house¨ y el ViroSeq para evaluar la fidelidad (trueness en verde); PC: Control Positivo; Reprod-A, -B and –C: Réplicas generadas para evaluar la reproducibilidad (rojo); Repet-A, -B and -C: Réplicas generadas para evaluar la repetitividad (azul).

**Anexo 5: Operacionalización de las variables:**

| Variable | Tipo | Operacionalización | Descripción |
|---|---|---|---|
| Edad | Cuantitativa discreta | 15-20<br>21-30<br>31-40<br>>40 | Edad en años cumplidos. |
| Sexo | Cualitativa nominal dicotómica | Femenino<br>Masculino | Según sexo biológico del individuo. |
| Orientación sexual | Cualitativa nominal | -Heterosexual<br>-Homosexual<br>-Bisexual | -Solo con personas del otro sexo.<br>-Solo con personas del mismo sexo.<br>-Con personas de ambos sexos. |
| CD4 al momento de la toma de la muestra para el estudio de la resistencia | Cuantitativa discreta | ≤25% ≤400 células/mm3 Riesgo<br>>25% >400 células/mm3 No riesgo | Valor del conteo de linfocitos T CD4+ al momento de solicitar el estudio de resistencia. |
| Carga viral al momento de la toma de la muestra para el estudio de la resistencia | Cuantitativa discreta | ≥1000 UI/mm3 Riesgo<br><1000 UI/mm3 No Riesgo | Valor de la carga viral al momento de solicitar el estudio de resistencia. |
| Subtipo de VIH | Cualitativa nominal | A, B, C, D, F, G, H, J, K, FRC y FRU | Subtipo Viral que se identifica en la muestra del paciente. |
| Número de terapias previas que ha utilizado el paciente | Cuantitativa discreta | 1, 2, 3 o más | Número de veces que el paciente ha cambiado de una terapia a otra. |
| Mutaciones de resistencia | Cualitativa nominal | Sí tiene<br>No tiene | Presencia de mutaciones asociadas a resistencia. |
| Nivel de resistencia | Cualitativa nominal | Alta<br>Intermedia<br>Baja | Niveles de resistencia a las drogas ARVs, detectados en las muestras de virus del paciente. |

# PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS.**

**Publicaciones científicas del autor que se relacionan con la tesis.**


1. Pérez L, Alemán Y, Correa C, Pérez J, Fonseca C, Aragonés C, D Pérez, Alvarez A, Vandamme AM, Kourí V, Van Laethem K. Molecular epidemiology of antiretroviral resistance in therapy-experienced HIV-1 patients in Cuba (2009). Journal of the International AIDS Society 2010,13 (Suppl 4): P141.
2. Pérez L; Correa C; Alemán Y; González I; Pérez J; Martínez PA; Álvarez A; Soto Y and Kourí V. Drug-resistant HIV-1 in Cuban Children and their Seropositive Mothers. MEDICC Review 2011; 13 (2): 24-31.
3. Alemán Y, Kourí V, Abrahantes Y, Pérez L, Martínez P A, Correa C, Álvarez A, Soto Y, Fonseca C, Aragonés C, Pérez J, Pérez D, Calás V, Veja B, Abad Y, Van Laethem K, Vandamme AM; Moutschen M. Caracterización de algunos marcadores de progresión rápida a SIDA en individuos cubanos seropositivos a VIH-1. VacciMonitor 2011; 20 Supplement 1.
4. Perez L, Alemán Y, Correa C, Fonseca C, Aragones C, Alvarez A, Kouri V, Vandamme A and Van Laethem K. Antiretroviral drug resistance in HIV-1 therapy-naive patients in Cuba, 2006-2011. Journal of the International AIDS Society 2012,15(Suppl 4):18185.
5. Perez L, **Alemán Y,** Correa C, Aragones C, Gonzalez I, Perez J, Alvarez A, Perez L, Kouri V, Vandamme A, Van Laethem K. Antiviral drug resistance in Cuban children infected with HIV-1. Journal of the International AIDS Society 2012,15(Suppl 4):18186.
6. Kourí V, Alemán Y, Pérez L, **(Contribuyeron en igual medida: Kourí V, Alemán Y, Pérez L)**. Pérez J, Fonseca C, Correa C, Aragonés C, Campos J, Álvarez D, Schrooten Y, Dekeersmaeker N, Imbrechts S, Beheydt G, Vinken L, Pérez D, Álvarez A, Soto Y, Vandamme AM, Van Laethem K. High frequency of antiviral drug resistance and non-B subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. J Clin Virol. 2012; 55:348-55.
7. Pérez L, Kourí V, Alemán Y, **(Contribuyeron en igual medida: Pérez L, Kourí V, Alemán Y)**. Abrahantes Y, Correa C, Aragonés C, Martínez O, Pérez J, Fonseca C, Campos J, Álvarez D, Schrooten Y, Dekeersmaeker N, Imbrechts S, Beheydt G, Vinken L, Soto Y, Álvarez A, Vandamme AM, Van Laethem K. Antiretroviral drug resistance in

HIV-1 therapy-naive patients in Cuba. Infection, Genetics and Evolution. 16. 2013; 144–150.

8. Kouri V, Alemán Y, Perez L, Perez J, Fonseca C, Correa C, Aragones C, Campos J, Alvarez D, Schrooten Y, Vinken L, Limia C, Soto Y, Vandamme AM and Van Laethem K. High frequency of antiviral drug resistance and non-b subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. Journal of the International AIDS Society 2014,17(Suppl 3):19754.

9. Kourí V, Pérez L, Alemán Y, **(Contribuyeron en igual medida: Kourí V, Alemán Y, Pérez L)** Pérez J, Fonseca C, Abrahantes Y, Aragonés C, Correa C, Martínez O, Ortega L.M., Pérez D, Campos J, Álvarez A, Soto Y, Limia C.M., Álvarez D, Pérez-Lastre J, González I, Millán J.C., Barrios C, Lantero M.I. y Joanes J. Vigilancia de la resistencia antirretroviral (ARV) y variantes genéticas de VIH-1, en Cuba. 2007-2011. Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. Vol.4, No.2, Año 2014.

10. Alemán Y, Vinken L, Kourí V, Pérez L, Álvarez A, Abrahantes Y, et al. (2015) Performance of an In-House Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genotyping System for Assessment of Drug Resistance in Cuba. PLoS ONE 10(2): e0117176. doi:10.1371/journal.pone.0117176.

11. Kouri V, Khouri R, Alemán Y, Abrahantes Y, Vercauteren J, Pineda-Peña A.C., Theys K, Megens S, Moutschen M, Pfeifer N, Van-Weyenbergh J, Pérez A.B., Pérez J, Pérez L, Van-Laethem K, Vandamme A.M. CRF19_cpx is an Evolutionary fit HIV-1 Variant Strongly Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba. EBioMedicine 2 (2015) 244–254.

12. Kourí V, Alemán Y, **(Contribuyeron en igual medida: Kourí V, Alemán Y)**. Díaz D, Pérez L, Limia C.M., Soto Y, Martínez Y, Baños Y, Caturla Y, Campos J, Ortega L.M., Pérez J, Hengge U: Co-Receptor Tropism Determined by Genotypic Assay in HIV-1 Circulating in Cuba. Journal of AIDS & Clinical Research 01/2016; 7(7). DOI:10.4172/2155-6113.1000592.

13. Kourí V, Alemán Y, **(Contribuyeron en igual medida: Kourí V, Alemán Y)**. Khouri R, Abrahantes Y, Pérez L, Pérez J, Vandamme A.M, Pérez A.B, Van-Laethem K, Fonseca C, Moutschen M, Alvarez A, Soto Y, Limia C.M., Martínez Y, Baños Y, García

Y. “Variante Viral de VIH-1 asociada con rápida progresión a SIDA en individuos cubanos”. Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. Vol.6, No.3, Año 2016.

14. Kourí V, Alemán Y, Pérez L, Martínez Y, Pérez J, Fonseca C, Ortega LM, Baños Y, Pintos Y, Soto Y, Campos J. Surveillance of HIV-1 subtype and antiretroviral resistance in Cuban individuals failing therapy during 2009-2016. Journal of the International AIDS Society 2017; 20 (Supl 2): 41-42.

15. Alemán Y, Kouri V, Pérez L, Pérez J, Fonseca C, Ortega L.M., Díaz D, Soto Y, Martínez Y, Campos J, Limia CM, Álvarez D. Impacto de la aplicación de los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 en la terapia antirretroviral en Cuba. 2009-2015. Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba Vol. 6 No. 3.

16. **Yoan Alemán-Campos BS-MS,** Vivian Kourí-Cardellá MD MS PhD DrSc, Lissette Pérez-Santos MS PhD, Carlos Fonseca-Gómez MD MS, Jorge Pérez-Avila MD MS, Lilia M. Ortega-González MD MS, Yoanna Baños-Morales, Alina Álvarez-López, Consuelo Correa-Sierra MD MS PhD, Yenisleidys Martínez-Montesinos MS, Yudira Soto-Brito MS PhD, Celia M. Limia-León MS, Jorge Campos-Díaz, Yaniris Caturla-Fernández, Delmis Alvarez-Gainza MS, Yanet Pintos-Saavedra, Ana L. Añé-Kourí MD, José Joanes-Fiol MD MS. HIV-1 Antiretroviral Resistance in Cuba, 2009–2014. MEDICC Review, July 2018, Vol 20, No. 3.

**Eventos en los que han sido presentados los resultados de esta tesis.**

1. Congreso 70 aniversario del IPK, VII congreso cubano de Microbiología y Parasitología. IV Congreso nacional de Medicina Tropical. Cuba, 2009. “Caracterización Filogenética de muestras de VIH de pacientes cubanos con rápida progresión a SIDA”.
2. Taller de Interpretación de Estudios de Resistencia. 25-26 de noviembre del 2009, Ciudad de La Habana, Cuba.
3. Taller de Interpretación de Estudios de Resistencia (VIH) dirigido a médicos clínicos. 16 y 17 de diciembre del 2009. Ciudad de La Habana, Cuba.
4. Evento GP SIDA. Mayo 2010, Habana, Cuba.
   a. Caracterización molecular de VIH-1 de pacientes cubanos con rápida progresión a SIDA.
   b. Resistencia de VIH-1 a drogas ARV en pacientes cubanos con falla a la terapia.

5. 10th Congreso Internacional de Terapia en la Infección por VIH. 2010 Glasgow, Reino Unido. Molecular epidemiology of antiretroviral resistance in therapy-experienced HIV-1 patients in Cuba.

6. Jornada Científica Institucional de la Brigadas Técnica Juveniles. IPK, 2010. Caracterización de algunos marcadores de rápida progresión a SIDA en individuos cubanos seropositivos a VIH-1.

7. Evento GP SIDA. Cuba, 2011. Actualización en los estudios de Epidemiología Molecular del VIH y Resistencia Antirretroviral en pacientes cubanos.

8. Curso avanzado en la interpretación clínica de los resultados de las pruebas de resistencia de VIH a las drogas antirretrovirales (ARV). Cuba, 2011.

9. 7mo Congreso de Inmunología. Cuba, 2011. Caracterización virológica de muestras de pacientes cubanos con rápida progresión a SIDA.

10. Congreso de la Sociedad Internacional de SIDA (IAS). Italia, 2011. Antiretroviral resistance of HIV-1 in individuals presenting therapeutic failure and subtypes distribution in Cuba.

11. Taller de buenas prácticas clínicas al inicio del "Ensayo Clínico TERAVAC": Evaluación de la seguridad e indicios de efecto terapéutico con el empleo del candidato vacunal Teravac VIH-1. Ensayo Fase 1, controlado, aleatorizado, con doble cegamiento. Cuba, 29 Feb. 2012.

12. 11th International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Glasgow, Reino Unido, 2012.

   a. Antiviral drug resistance in Cuban children infected with HIV-1.
   b. Antiretroviral drug resistance in HIV-1 therapy-naïve patients in Cuba, 2006-2011.

13. 1er Taller de Virología Médica: Avances y Retos. 2013.

14. IX Jornada Latinoamericana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional. IV Taller Internacional de Hemofilia. III Conferencia del Caribe sobre Drepanocitosis. III Simposio Internacional de Medicina Regenerativa. VII Congreso Cubano de Hematología. La Habana, mayo 20-24, 2013. Marcadores virológicos e inmunológicos asociados con rápida progresión a SIDA en pacientes cubanos.

15. VIII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, V Congreso Nacional de Medicina Tropical y V Simposio Internacional de VIH/SIDA en Cuba, 14-16 de Octubre, 2014, Habana, Cuba.

a. Marcadores virales e inmunológicos asociados con rápida progresión a SIDA en pacientes cubanos.
b. Resistencia antirretroviral del VIH-1 en pacientes no tratados en Cuba.
c. Vigilancia de la variabilidad genética y la resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales en pacientes con fallo a la terapia en Cuba.
d. Epidemiología molecular de secuencias de VIH-1 aisladas entre enero 2008 y julio 2013 en Cuba.

16. Evento GP SIDA 2014, Sanatorio de Santiago de Las Vegas, La Habana, Cuba: "Variantes genéticas de VIH-1 en Cuba y asociación con progresión rápida de la enfermedad".

17. Congreso de Farmacología. II Encuentro de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias 2014. "Altos niveles de resistencia antirretroviral y de subtipos no B de VIH-1 en pacientes cubanos".

18. HIV Glasgow 2014. "High frequency of Antiviral Drug Resistance and non-B Subtypes in HIV-1 Patients Failing Antiviral Therapy in Cuba During 2009-2013".

19. First International Convention Inmunopharmacology-Vaccifarma 2015. III international Congress on Inmunopharmacology (Inmunopharmacology 2015). III international Congress on Pharmacology of Vaccines (Vaccifarma 2015). High frequency of Antiviral Drug Resistance and non-B HIV-1 Subtypes in Cuba.

20. 25th Annual Meeting of the Society for Virology (GfV). 18-21 March 2015. Bochum. Germany.

21. Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. (CROI 2015). Febrero 2015. Boston, EU. FRC19_cpx Is an Evolutionary Fit HIV-1 Variant Exclusively Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba.

22. Taller de actualización y continuidad del Ensayo Clínico TERAVAC-VIH-1. 2015. La Habana, Cuba.

23. Concurso de Jóvenes Investigadores del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente y la Academia de Ciencias de Cuba, La Habana. 2016.

24. Concurso del Pleno del Consejo Nacional de Sociedades Científicas de la Salud, La Habana. 2016.

25. 3er Taller de Virología Médica: Desafíos del Siglo XXI. 2016 La Habana, Cuba.

26. Jornada de Atención Integral a Personas con VIH/SIDA "31 Aniversario del Sanatorio de Santiago de las Vegas" XII Evento Científico Nacional GPSIDA 26 al 28 de abril 2017, La Habana, Cuba. "Resistencia del VIH 1 a los antirretrovirales en Cuba. Diez años de experiencia".

27. HIV y Hepatitis en America, Brasil 2017. "Surveillance of HIV-1 subtype and antiretroviral resistance in Cuban individuals failing therapy during 2009-2016".

**Premios obtenidos con los resultados de esta tesis.**

1. Resultado relevante Institucional. 2012. IPK. Vigilancia de la resistencia antirretroviral y variantes genéticas de VIH-1 en cuba. 2007-2011. **(Autores principales: Vivian Kourí, Yoan Alemán, Lissette Pérez)**.

2. Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2013. Vigilancia de la resistencia antirretroviral (ARV) y variantes genéticas de VIH-1, en Cuba. (2007-2011). **(Autores principales: Vivian Kouri, Lissette Pérez y Yoan Alemán).**

3. Premio Anual del Consejo Nacional de Sociedades Científicas de la Salud, Año 2013, en la Categoría de Artículo Científico por el Trabajo: "Alta frecuencia de resistencia a las drogas antirretrovirales (ARV) y de subtipos no B de VIH-1 en pacientes cubanos infectados con fallo a la terapia". **(Autores principales: Vivian Kourí, Yoan Alemán, Lissette Pérez)**.

4. Premio Anual de Salud, Año 2013, en la categoría de Artículo Científico. "Alta frecuencia de resistencia a las drogas antirretrovirales (ARV) y de subtipos no B de VIH-1 en pacientes cubanos infectados con fallos a la terapia". **(Autores principales: Vivian Kourí, Yoan Alemán, Lissette Pérez).**

5. Premio Anual del Consejo Nacional de Sociedades Científicas de la Salud, Año 2013, en la Categoría de Artículo Científico por el Trabajo: "Resistencia del VIH-1 a las drogas antirretrovirales en pacientes no tratados en Cuba". **(Autores principales: Lissette Pérez, Vivian Kourí, Yoan Alemán)**.

6. Premio Anual de Salud, Año 2014, en la categoría de Artículo Científico. “Resistencia del VIH-1 a las drogas antirretrovirales en pacientes no tratados en Cuba”. **(Autores principales: Lissette Pérez, Vivian Kourí, Yoan Alemán).**

7. Premio Anual del Consejo Nacional de Sociedades Científicas de la Salud en la Categoría de Artículo Científico por el Trabajo: “Realización de un sistema casero para la determinación del genotipo de VIH-1 y la evaluación de la resistencia a los antirretrovirales en Cuba.” **(Autores principales: Yoan Alemán, Vivian Kourí, Lissette Pérez).**

8. Premio Anual de Salud, Año 2016, en la categoría de Artículo Científico. “Performance of an in-house human immunodeficiency virus type 1 genotyping system for assessment of drug resistance in Cuba”. **(Autores principales: Yoan Alemán, Vivian Kourí, Lissette Pérez).**

9. Resultado relevante Institucional. 2016. IPK. “Impacto de la aplicación de los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 en la terapia antirretroviral en Cuba. 2009-2015.” **(Autores principales: Yoan Alemán, Vivian Kourí, Lissette Pérez)**.

10. Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2016. “Impacto de la aplicación de los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 en la terapia antirretroviral en Cuba. 2009-2015.” **(Autores principales: Yoan Alemán, Vivian Kourí, Lissette Pérez)**.

# PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL AUTOR NO RELACIONADAS CON TEMA DE LA TESIS

**PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL AUTOR NO RELACIONADAS CON EL TEMA DE LA TESIS**

1. P. Martínez, V. Kouri, **Y. Alemán**, O. Blanco, V. Capó, M.E. Rodríguez, M. Dovigny, L. Cardellá, A. Gala, N. Jiménez, C. Luzardo, C. Correa, L. Pérez, A. Alvarez, U. Hengge. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in AIDS-KS Cuban individuals and its relation with HHV-8 load: Evidence of subtype B expansion. Clinical Microbiology and Infection. Volume 16 Supplement No. 2, Page S335.

2. C. Correa, V. Kouri, D. Verdasquera, P.A. Martinez, A Alvarez, **Y. Alemán**, L. Perez, J. Viera, R. Gonzalez, E. Perez, l. Moro, M. Navarro, P. Melin. Diagnosis and screening for congenital CMV infection in pregnant women in Cuba as prognostic markers of congenital cytomegalovirus in newborns. Clinical Microbiology and Infection. Volume 16 Supplement No. 2, Page S326

3. Correa CB, Kourí V, Verdasquera D, Martínez PA, Álvarez A, **Alemán Y**, Pérez L, Viera J, González R, Pérez E, Moro I, Navarro MA and Melin P. HCMV seroprevalence and associated risk factors in pregnant women, Havana City, 2007 to 2008. Prenatal Diagnosis. Prenat Diagn 2010; 30: 888–892.

4. Kourí V, Correa CB, Verdasquera D, Martínez PA, Alvarez A, **Alemán Y**, Pérez L, Golpe MA, Someilán T, Chong Y, Fresno C, Navarro MA, Pérez E, Moro I, Sanchez R, Llanusa C, Melin P. Diagnosis and screening for Cytomegalovirus infection in pregnant women in Cuba as prognostic markers of congenital infection in newborns. 2007-2008. Pediatrc Infect Dis J. 2010; 29(12): 1105-1110.

5. Kourí V, Martínez PA, Blanco O, Capó V, Rodríguez ME, Dovigny MC, Cardella´ L, Gala A, Jiménez NA, Luzardo C, Correa C, **Alemán Y**, Pérez L, Álvarez A, Hengge U. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus load in asymptomatic contacts of Cuban epidemic KS patients. Arch Virol. 2010; 155(12):1971-1976.

6. Kourí V, Martínez PA, Blanco O, Capó V, Rodríguez ME, Dovigny MC, Cardella´ L, Gala A, Jiménez NA, Luzardo C, Correa C, **Alemán Y**, Pérez L, Álvarez A, Hengge U. Simultaneous quantification of Human Herpesvirus 8 by real-time PCR in different tissues of AIDS Cuban patients with Kaposi's sarcoma. Herpesviridae 2010 1;3.

7. Correa C, Martínez PA, Pérez L, Álvarez A, **Alemán Y**, Soto Y, Kourí V. Role of Herpesvirus as a Cause of Mononucleosis-Like and Febrile Syndromes in Cuba, 2006–2009. MEDICC Review 2011; 13 (4):45-49.

8. C Correa, PA Martínez, V Kourí, L Pérez, **Y Alemán**, Y Soto, A Álvarez. Herpesvirus asociados a infección congénita o síndrome mononucleósico en pacientes con sospecha clínica en Cuba, 2006-2010. VacciMonitor 2011; 20 Supplement 1.

9. PA Martínez, V Kourí, G Cordero, Y Soto, V Capó, C Correa, **Y Alemán**, L Pérez, A Álvarez, C Silvério, N Hondal, M González1, I Álvarez, E Dorticós, A Arencibia, M Silva, JC Jaime, S Sarduy, J Florin, L Pérez, IP Duran, JJ Marchena, L Solar. Primer reporte en Cuba de la infección por poliomavirus en individuos seropositivos al VIH-1 y receptores de trasplante. VacciMonitor 2011; 20 Supplement 1.

10. V Kourí, C Correa, PA Martínez, A Álvarez, L Pérez, **Y Alemán**, Y Soto, G González, C Savón, C Silvério, N Hondal, M González, I Álvarez, E Dorticós, A Arencibia, M Silva, JC Jaime, S Sarduy, J Florín, L Pérez, IP Duran, JJ Marchena, L Solar. Implementación en Cuba del monitoreo de los principales agentes virales que afectan a pacientes receptores de trasplante en edad pediátrica. VacciMonitor 2011; 20 Supplement 1.

11. Soto Y; Kourí V; Martínez PA; Correa C; Torres G, Goicolea A, Morier L; Capó V, Pérez L; **Alemán Y**; Rodríguez H; Álvarez A. Normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación de Papilomavirus Humanos de alto riesgo oncogénico. Vaccimonitor 2012. Vol. 21 (1): 30-37.

12. Martínez PA, Kourí V, Cordero G, Correa C, Soto Y, Capó V, González L, Grá B, Petirena G, Silvério C, Hondal N, González M, Alvarez I, Dorticós E, Arencibia A, Jaime JC, Florin J, Pérez L, Duran D, Marchena JJ, Solar L, Cazorla N, Pérez Y, **Alemán Y**, Pérez Lissette, Álvarez A. Assessment of infection with polyomaviruses BKV, JCV and SV40 in different groups of Cuban individuals. Arch Virol. 2011 157(2): 315-21.

13. Kouri V; Martínez PA; Capó V; Blanco O; Rodríguez ME; Jiménez NA; Fleites G; Caballero I; Dovigny MC; **Alemán Y;** Correa C; Pérez L; Soto Y; Cardellá L; Nambiar S; Hengge U; Álvarez A. Kaposi´s Sarcoma and Human Herpesvirus 8 in Cuba: Evidence of Subtype B expansion. Virology 2012; 432: 361-69.

14. Yudira Soto, Griselda Torres, Vivian Kourı, MD, Celia Marıa Limia, Adibel Goicolea, MD, Virginia Capo, MD, Lissette Perez, Ana Isabel de la Torre, MD, Ledy

Xiomara López, Anamays Govín, Consuelo Beatriz Correa, MD, **Yoan Alemán**, Alina Álvarez and Blanca Rosa Manzano, MD, DrSc. Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus Infections in Cervical Samples From Cuban Women Older Than 30 Years. Journal of Lower Genital Tract Disease, Volume 18, Number 03, 2013, 210-7.

15. Martínez Pedro Ariel, Kourí Vivian, Blanco Orestes, Capó Virginia, Abad Yoandra, **Alemán Yoan**, Verdasquera Denis, Jiménez Narciso, Caballero Iraida, Fleites Gilberto, Ugarte Yaumara, Calderón Odalys, Álvarez Alina, Ulrich Hengge. The Role of Human Herpesvirus Molecular Characterization in the Management of HIV Infected Patients Diagnosed with Malignancies Associated with Its Infection. World Journal of AIDS, 2013, 3, 221-230.

16. Consuelo B. Correa Sierra, Vivian Kourí Cardellá, Lissette Pérez Santos, **Yoan Alemán** Campos, Yudira Soto Brito, AlinaÁlvarez López, Ana L. Añé Kourí. Infecciones por virus de Epstein-Barr y citomegalovirus en pacientes con síndrome mononucleósico. Panorama Cuba y Salud. 2013;8(3):15-20.

17. Alexander Piñón Ramos, Belsy Acosta Herrera, Odalys Valdés Ramírez, Mayra Muné Jiménez, Amely Arencibia García, Clara Savón Valdés, Yamila Adams Villalón, Grehete González Muñoz, Suset Oropeza Fernández, Ángel Goyenechea Fernández, Guelsys González Báez, Bárbara Hernández Espinosa, Rosmery Roque Arrieta, Vivian Kourí Cardellá, **Yoán Alemán**, María Guadalupe Guzmán Tirado y Alina Llop Hernández. Aportes virológicos e inmunológicos para la prevención y el control de la influenza en Cuba. Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. Vol.4, No.2, Año 2014.

18. Yudira Soto Brito, Celia María Limia León, Vivian Kourí Cardellá, Adibel Goicolea, Griselda Torres, Virginia Capó, Orestes Andrés Blanco, Yanara García, María Victoria López, Maria Eugenia Toledo, Mayra Muné, Ledy Xiomara López, Ana Isabel de la Torre, Anamays Govín, Anny Pérez, Dagnelia Castillo, Luis Morier, Yamira Caballero, Hermis Rodríguez, Rosa Irene Álvarez, Xiomara Escobar, Adanays Calvo, Lissette Pérez, Consuelo Beatriz Correa, Pedro Ariel Martínez, **Yoan Alemán**, Lilliam Rodríguez, Yoana Baños, Agueda Santana y Blanca Rosa Manzano. "Impacto de la infección por Papilomavirus humanos en el desarrollo de lesiones precursoras de cáncer en individuos cubanos". 2007-2012. Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. Vol.5, No.3, Año 2015.

19. Resik S, Tejeda A, Mach O, Fonseca M, Díaz M, Alemany N, Hung LH, **Aleman Y**, Mesa I, García G, Sutter RW. Does Simultaneous Administration of Bivalent (Types 1 and 3) Oral Poliovirus Vaccine and Inactivated Poliovirus Vaccine Induce Mucosal Cross-immunity to Poliovirus Type 2? **Clinical Infectious Diseases** 2018;67(S1):S51–6.

20. Sonia Resik Aguirre, Autores: Alina Tejeda Fuentes, Manuel Emilio Díaz González, Nilda Alemañy Bueno, Magilé Fonseca Quintana, Lai Heng Hung Ricardo, Gloria García González, Damarys Concepción Díaz, Luis Morier Díaz, **Yoan Alemán Campos,** Ileana Mesa Pedroso, Marila de la Caridad Rivero Caballero, Danay García Sardiña, Ondrej Mach, Roland Sutter. Nuevos aportes cubanos al Programa Mundial de Erradicación de la Poliomielitis (2014-2018). Anales de la Academia de Ciencias de Cuba; Vol. 9, No. 3 (2019)

21. Resik S, Mach O, Tejeda A, Jeyaseelan V, Fonseca M, Diaz M, Alemany N, Hung LH, **Aleman Y**, Mesa I, Garcia G, Sutter RW. Immunogenicity of Intramuscular Fractional Dose of Inactivated Poliovirus Vaccine. J Infect Dis. 2020 Mar 2;221(6):895-901. doi: 10.1093/infdis/jiz323. PubMed PMID: 31242300.