



**Validación de una técnica in-house para identificar el perfil genético del
VHI-1 asociado a farmacorresistencia**

CATLEYA ABELLA BARRETO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ
2019**



**Validación de una técnica in-house para identificar el perfil genético del
VHI-1 asociado a farmacorresistencia**

CATLEYA ABELLA BARRETO

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Ciencias biológicas

Tutores

MSc. Juliana Barbosa Ramírez

Grupo de virología Instituto Nacional de Salud

PhD. Olga Raquel Villamizar

Profesora asociada Pontificia Universidad Javeriana

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BOGOTÁ

2019

**Validación de una técnica in-house para identificar el perfil genético del
VHI-1 asociado a farmacoresistencia**

CATLEYA ABELLA BARRETO

Aprobado

Concepción Puerta B, PhD
Decana
Facultad de ciencias



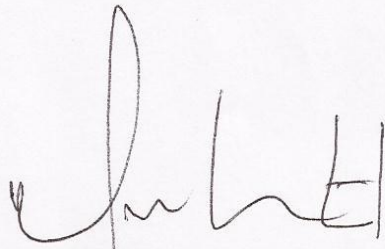
Alba Alicia Trespalacios, PhD
Directora de posgrados
Facultad de ciencias



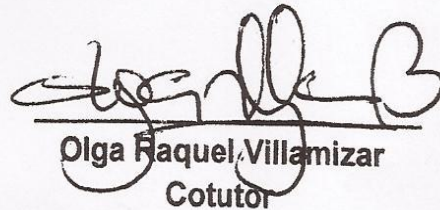
**Validación de una técnica in-house para identificar el perfil genético del VHI-
1 asociado a farmacorresistencia**

CATLEYA ABELLA BARRETO

Aprobado



Juliana Barbosa
Tutor



Olga Raquel Villamizar
Cotutor



Lidia Theodoro Boulosa
Jurado 1



Bertha Gómez
Jurado 2

Dedicatoria

A mi madre por demostrarme que nunca es tarde para cumplir nuestras metas por mas inalcanzables que las sientas.

A mi padre por darme el espíritu soñador.

A mis hermanos por su apoyo en cada paso de mi vida.

A Jorge Eliecer por creer en mí y ser el compañero fiel de todos mis pasos.

A mis hijas María Helena y Samanta por ser mi mayor orgullo, siempre cariñosas y comprensivas.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Formulación del problema de investigación	15
1.2. Justificación	17
2. MARCO TEORICO.....	19
2.1. Generalidades VIH/SIDA.....	19
2.1.1. Clasificación taxonómica	19
2.1.2. Clasificación filogenética	19
2.1.3. Estructura del virión.....	22
2.1.4. Ciclo de replicación del VIH-1	26
2.2. Tratamiento Antiretroviral	30
2.2.1. Clases de medicamentos antiretrovirales	31
2.2.2. Esquema de tratamiento antirretroviral en Colombia.....	39
2.3. Variabilidad genética del virus.	40
2.4. Resistencia a los antiretrovirales	41
2.4.1. Medición de la resistencia a los fármacos antirretrovirales (ARV)	42
2.4.2. Clasificación e interpretación de mutaciones de fármaco resistencia.....	43
2.5. Evaluación del desempeño de un método para genotipificar VIH	48
3 PREGUNTA DE INVESTIGACION	51
4 OBJETIVOS	52
4.1 Objetivo general	52
5 METODOLOGIA.....	52
5.1 Tipo de estudio:.....	52

5.2	Tipo de muestra:	52
5.2.1	Material Quality control (MQC).....	52
5.2.2	Muestras de Plasma positivo para VIH-1:.....	53
5.2.3	Plasma anticoagulado con EDTA negativo.....	54
5.3	Estandarización de la técnica de genotipificación in house	58
5.3.1	Extracción de ácidos nucleicos	58
5.3.2	Amplificación región que codifica para la proteasa (PR) y transcriptasa inversa (TI) del gen pol del VIH-1.....	60
5.3.3	Purificación de productos de PCR	61
5.3.4	Reacción de secuencia.....	61
5.3.5	Purificación de la reacción de secuencia	62
5.3.6	Análisis de las secuencias.....	62
5.4	Evaluación del desempeño de la técnica in-house.....	62
5.4.1	Análisis del límite de detección y sensibilidad analítica de la PCR en plasma y GSS.....	62
5.4.2	Precisión (Repetibilidad y precisión intermedia o reproducibilidad)	64
5.4.3	Linealidad.....	64
5.5	Análisis de concordancia entre las técnicas para detectar mutaciones asociadas a farmacorresistencia.....	64
6	RESULTADOS.....	66
6.1	Objetivo específico 1.....	66
6.1.1	Estandarización de la PCR en plasma.....	66
6.1.2	Estandarización de la PCR en papel filtro.....	68
6.2	Objetivo específico 2.....	69
6.2.1	Sensibilidad analítica o límite de detección de la PCR	69
6.2.2	Análisis de Precisión	71
6.2.3	Linealidad.....	81
6.3	Objetivo específico 3.....	83
6.4	Objetivo específico 4.....	88
7	DISCUSIÓN	92
8	CONCLUSIONES.....	94

9 BIBLIOGRAFIA..... 95

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. FORMAS RECOMBINANTES CIRCULANTES DEL VIH-1 GRUPO M REPORTADAS HASTA EL AÑO 2017.	21
TABLA 2. PROTEÍNAS DEL VIH-1 Y SU FUNCIÓN	25
TABLA 3. FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA NO ANÁLOGOS A LOS NUCLEÓSIDOS APROBADOS POR LA FDA.	34
TABLA 4. TABLA FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA ANÁLOGOS A LOS NUCLEÓSIDOS APROBADOS POR LA FDA.	36
TABLA 5. FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA INTEGRASA APROBADOS POR LA FDA	37
TABLA 6. FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA PROTEASA APROBADOS POR LA FDA.	38
TABLA 7. ESQUEMAS DE TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL MÁS USADOS EN COLOMBIA	39
TABLA 8. MECANISMOS DE RESISTENCIA Y PRINCIPALES MUTACIONES REPORTADAS EN EL GEN <i>POL</i> DEL VIH-1 QUE TRANSCRIBE PARA LAS ENZIMAS TRANSCRIPTASA INVERSA, PROTEASA E INTEGRASA.	44
TABLA 9. MATERIAL QUALITY CONTROL (MQC).	55
TABLA 10. MATERIAL QUALITY CONTROL GSS	58
TABLA 11. ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL DE GSS.	60
TABLA 12. REPORTE DE MUTACIONES OBTENIDAS ANALIZANDO LAS SECUENCIAS DEL INS Y CFE EN EL HIVDB PROGRAM	67
TABLA 13. RESULTADO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DEL GEN <i>POL</i> QUE CODIFICA PARA PR Y RT USANDO BUFFER DE LISIS Y SOLUCIÓN SALINA ESTÉRIL PARA ELUIR LAS GOTAS DE SANGRE SECA EN PAPEL FILTRO.	68
TABLA 14 RESULTADO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DEL GEN <i>POL</i> QUE CODIFICA PARA PR Y RT COMPARANDO EL TIEMPO Y TEMPERATURA DEL ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA DE GSS.	69
TABLA 15. RESULTADO DE LA PRUEBA DE LÍMITE DE DETECCIÓN O SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE LA PCR EN PLASMA	70
TABLA 16 RESULTADO DE LA PRUEBA DE LÍMITE DE DETECCIÓN O SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE LA PCR EN PAPEL FILTRO	71
TABLA 17. NÚMERO DE NUCLEÓTIDOS SIMILARES OBTENIDOS ENTRE REPLICAS INTRACORRIDA.	72
TABLA 18. PRECISIÓN EN LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS, AMINOÁCIDOS Y MUTACIONES DE FARMACORRESISTENCIA.	73
TABLA 19. NÚMERO DE AMINOÁCIDOS SIMILARES OBTENIDOS ENTRE REPLICAS INTRACORRIDA.	74
TABLA 20. PORCENTAJE DE SIMILITUD EN SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE RÉPLICAS INTERCORRIDA.	75
TABLA 21. MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR ENTRE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS INTRA E INTERCORRIDA.	76
TABLA 22. PRUEBA DE F PARA VARIANZAS DE DOS MUESTRAS	77
TABLA 23. PRUEBA T PARA DOS MUESTRAS SUPONIENDO VARIANZAS IGUALES	77
TABLA 24. PORCENTAJE DE SIMILITUD EN SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE RÉPLICAS INTERCORRIDA.	78

TABLA 25. MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR ENTRE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS INTRA E INTERCORRIDA.	79
TABLA 26. PRUEBA DE F PARA VARIANZAS DE DOS MUESTRAS	80
TABLA 27. PRUEBA T PARA DOS MUESTRAS SUPONIENDO VARIANZAS IGUALES.	80
TABLA 28. LINEALIDAD DE LA TÉCNICA IN HOUSE.	81
TABLA 29 .TABLA DE CONTINGENCIA PARA DETERMINAR CONCORDANCIA ENTRE LOS DMRs DETECTADOS POR LA TÉCNICA IN-HOUSE VS LA TÉCNICA DE CFE.	84
TABLA 30. MUTACIONES DE AMINOÁCIDOS ASOCIADOS A FARMACORRESISTENCIA OBTENIDAS CON LOS DOS MÉTODOS IN-HOUSE VS CFE.	85
TABLA 31.TABLA DE CONTINGENCIA PARA DETERMINAR CONCORDANCIA ENTRE LOS DMRs DETECTADOS POR LA TÉCNICA IN-HOUSE VS VIROSEQ.	89
TABLA 32. MUTACIONES DE AMINOÁCIDOS ASOCIADOS A FARMACORRESISTENCIA OBTENIDAS CON LOS DOS MÉTODOS IN-HOUSE VS CFE.	90

LISTA DE FIGURAS

FÍGURA 1. ESTRUCTURA DE LA POLIPROTEÍNA GAG DEL VIH-1, MUESTRA LAS UBICACIONES DE MA, CANTD, CACTD, SP1, NC, SP2, Y P6.	23
FÍGURA 2. LA ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DEL VIH-1 Y LA ESTRUCTURA DE RT.	24
FÍGURA 3. INTEGRACIÓN DEL GENOMA DEL VIH-1 AL GENOMA CELULAR.	28
FÍGURA 4. MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA ENTRADA DEL VIH-1 A LA CÉLULA.	32
FÍGURA 5. ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE FUSIÓN DEL VIH-1 A LA MEMBRANA CELULAR.	33
FÍGURA 6. ACCIÓN QUE EJERCEN LOS INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA NO ANÁLOGOS A NUCLEÓSIDOS.	34
FÍGURA 7. ACCIÓN QUE EJERCEN LOS INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA ANÁLOGOS A NUCLEÓSIDOS.	35
FÍGURA 8. EL INHIBIDOR DE LA INTEGRASA RALTEGRAVIR TIENE AFINIDAD POR LA INTEGRASA VIRAL PREVIENIENDO LA FUSIÓN DEL ADN VIRAL EN EL ADN CROMOSÓMICO.	37
FÍGURA 9. RECOMBINACIÓN DEL GENOMA VIRAL DURANTE LA TRANSCRIPCIÓN INVERSA DEL ARN. .	41
FÍGURA 10. ÁRBOL FILOGENÉTICO CONSTRUIDO CON 32 SECUENCIAS DE LA REGIÓN QUE CODIFICA PARA LA RT Y PR VIRAL EMITIDAS POR EL CENTRO PARA LA EXCELENCIA EN VIH / SIDA (CFE) EN VANCOUVER-CANADÁ COMPARADAS CON LOS SUBTIPOS DE REFERENCIA DEL GRUPO M DE LA BASE DE DATOS ALAMOS HIV. A) EN TODAS LAS MUESTRAS SELECCIONADAS SE IDENTIFICARON SUBTIPOS B Y NO B DE VIH-1. B) DENTRO DE LOS SUBTIPOS NO B SE IDENTIFICÓ UNA CEPA RECOMBINANTE CRF 02_AG Y SUBTIPO F.	54
FÍGURA 11. SANGRE SECA EN PAPEL FILTRO.	59
FÍGURA 12. PROCESO DE DILUCIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA POSITIVO PARA VIH EN SOLUCIÓN DE NaCl AL 0.9%.	63
FÍGURA 13. PROCESO DE DILUCIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA POSITIVO PARA VIH EN SANGRE TOTAL NEGATIVA PARA VIH ANTI COAGULADA CON EDTA (WHO, 2012).	63
FÍGURA 14. DETERMINACIÓN TEMPERATURA OPTIMA DE ANILLAMIENTO. MUESTRAS CFE-116, CFE-117, CFE-118, CN: PLASMA NEGATIVO PARA VIH POR ELISA DE CUARTA GENERACIÓN.	66
FÍGURA 15. SIMILITUD ENTRE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS EN EL INS VS LA TÉCNICA IN-HOUSE DEL CFE. DENDROGRAMA OBTENIDO CON EL MÉTODO NEIHBORG JOINING, MODELO KIMURA-2-PARÁMETROS (0.5).	67
FÍGURA 16. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN DE LA PCR O SENSIBILIDAD ANALÍTICA USANDO PLASMA COMO MATRIZ.	70
FÍGURA 17. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN DE LA PCR O SENSIBILIDAD ANALÍTICA USANDO GOTA DE SANGRE SECA COMO MATRIZ.	71
FÍGURA 18. LINEALIDAD EN LA SECUENCIACIÓN VS CARGA VIRAL DE LA MUESTRA.	82
FÍGURA 19. SIMILITUD ENTRE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS EN EL INS VS LA TÉCNICA IN-HOUSE DEL CFE. DENDROGRAMA OBTENIDO CON EL MÉTODO NEIHBORG JOINING, MODELO NO. OF DIFFERENCES (0.5).	83
FÍGURA 20. SIMILITUD ENTRE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS EN EL INS VS LA TÉCNICA VIROSeq. DENDROGRAMA OBTENIDO CON EL MÉTODO NEIHBORG JOINING, MODELO NO. OF DIFFERENCES (0.5).	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

ARV: antiretrovirales

CFE: Centro para la Excelencia en VIH / SIDA

CRF: formas recombinantes

CAC: Cuenta de alto costo

DRMs: Drug resistance mutations.

EIA: Enzimoimmunoensayo.

FDA: Food Drug Administration.

IC: Intervalo de confianza

IN: inhibidores de la integrasa

IPs: Inhibidores de la proteasa

ITIN: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos a los nucleósidos.

ITINN: Inhibidores de la transcriptasa inversa NO análogos a los nucleósidos

GSS: gota de sangre seca.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PR: proteasa

RT: Retrotranscriptasa

TAR: Tratamiento antiretroviral

VIH-1: virus de inmunodeficiencia humana tipo 1.

VIH-2: virus de inmunodeficiencia humana tipo 2.

Validación de una técnica in-house para identificar el perfil genético del VIH-1 asociado a farmacorresistencia

RESUMEN

El alto costo de los ensayos comerciales y el riguroso proceso de conservación del plasma para genotipificar, dificulta la vigilancia asociada a determinar la circulación de variantes del VIH-1 resistentes a los antirretrovirales en Colombia. Se estandarizó una técnica in-house para genotipificar la región que codifica la transcriptasa inversa (RT) y Proteasa (PR) del VIH-1 en plasma y gotas de sangre seca (GSS), utilizando 32 muestras de pacientes naive de subtipos B y no B (CRF 02-AG y F) del VIH-1, 11 de pacientes con previa exposición a TAR y 12 muestras de GSS, fortificadas con algunos de los plasma naive previamente descritos. En la evaluación del desempeño de la técnica se obtuvo una precisión entre réplicas de nucleótidos intracorrida del 99,94% (IC 95% entre 99,88 y 100) y de aminoácidos del 99,85% (IC 95% entre 99,66 y 100) y la precisión intermedia o intercorrida del 99,93% (IC 99,87 a 100) y 99,83% (IC 99,64 a 100) entre las secuencias de nucleótidos y aminoácidos respectivamente. Una sensibilidad analítica de la amplificación en plasma de 742 copias/ml y 5936 copias/ml en GSS, con un comportamiento lineal en muestras con cargas virales entre 3,03 Log₁₀ copias ARN/ml y 6,17 Log₁₀ copias ARN/ml de plasma. El porcentaje de amplificación en la matriz de GSS conservada fue del 54,4% y a temperatura ambiente del 36,4%. La concordancia de las mutaciones asociadas a resistencia obtenidas tuvo un alto nivel de concordancia frente a las dos técnicas de referencia con un índice kappa de 0,96. Por anterior se concluye que la prueba de genotipificación en desafío implementada estandarizada es eficaz para el diagnóstico de resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales.

ABSTRACT

The high cost of commercial trials and the rigorous process of plasma conservation to genotype difficult the monitor of drug resistant variants HIV-1 in Colombia. An in-house technique was standardized to genotype the region encoding the reverse transcriptase (RT) and Protease (PR) of HIV-1, using 32 plasma samples naive patients of B and non-B subtypes (CRF 02-AG and F) of HIV-1, 11 of patients with previous exposure to ART and 12 dried blood sample (DBS), fortified with some of the naive plasma previously described.

In the evaluation of the performance of the technique, a precision between replicas of 99.94% (95% CI 99.88 and 100%) and amino acids of 99.85% was obtained (95% CI 99.66 and 100%). % and intermediate precision of 99.93% (CI 99.87 at 100%) and 99.83% (CI 99.64 at 100%) between the nucleotide and amino acid sequences, respectively. An analytical sensitivity of the plasma amplification of 742 copies / ml and 5936 copies /ml in DBS, with a linear behavior between viral loads 3,03 Log₁₀ copias ARN/ml y 6,17 Log₁₀ copias ARN/ml of plasma sample. The percentage of amplification in DBS stored at 4 ° C was 60%. The concordance of the mutations associated with drug resistance (DMRs) obtained had a high level of agreement with the two reference techniques with a kappa index of 0.96. There for concluded that the genotyping test in challenge standardized implemented is effective for the diagnosis of resistance of HIV-1 to antiretroviral.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema de investigación

El SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) es el resultado de la replicación sistémica del virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) que en la mayoría de los casos si no se controla deteriora de manera progresiva el sistema inmunológico del huésped produciendo infecciones oportunistas y posteriormente su muerte (Engelman, Kessl, & Kvaratskhelia, 2013; WHO, 2017a). Existen dos tipos de VIH, el tipo 1 y el tipo 2. El VIH de tipo 1 (VIH-1) se divide en cuatro grupos: M, N, O y P en donde el grupo M es el causante de la pandemia del sida. El VIH-1 es un virus ARN con un tamaño de 10 Kb y pertenece a la familia Retroviridae del género Lentivirus. A pesar que los Lentivirus se caracterizan por un periodo de incubación muy largo y a la demora con que aparecen los signos de la enfermedad, el VIH-1 es considerado un virus de evolución rápida asociado a su elevada tasa de mutación (rango de 10⁻³ y 10⁻⁵ sustituciones x nucleótido) que resulta de la baja actividad o ausencia de correcciones de las ARN polimerasas dependientes de ADN (retro transcriptasas), sumado a las altas tasas de recombinación y de replicación viral (Martin et al., 2016; Metzner, 2016).

Es así como del VIH-1 del grupo M, se han identificado 9 subtipos (A,B,C,D,F,G,H,J,K), 6 subsubtipos (A1,A2,A3,A4,A5,A6,F1,F2)(B. T. Foley, Leitner, Paraskevis, & Peeters, 2016), 90 formas recombinantes circulantes (Alamos, 2017) y algunas cepas recombinantes únicas, que provienen de la recombinación intra e inter subtipos y subsubtipos (Gall et al., 2012).

Es por esta alta variabilidad genética que la genotipificación del virus resulta de vital importancia, tanto en el tratamiento individual, como en la salud pública el marco de la definición de líneas de tratamiento en zonas geográficas específicas. De esta manera se han formulado esquemas de Tratamiento antirretroviral (TAR) combinado, donde se administran simultáneamente varios fármacos buscando disminuir el impacto de la resistencia asociada a mutaciones genéticas.

El uso del Tratamiento antirretroviral (TAR) combinado ha tenido logros sin precedentes en el mundo, como el de transformar una enfermedad mortal en una de tipo crónico (Martin et al., 2016). La efectividad de TAR asociada al fármaco depende de una combinación apropiada y el sustento de concentraciones óptimas que permitan disminuir la carga viral a menos de 50 copias de ARN viral x ml de plasma. (Van Lint, Bouchat, & Marcello, 2013). Sin embargo la variabilidad genética del VIH-1 y las concentraciones subinhibitorias de los fármacos contribuyen a su capacidad de evadir el sistema inmune del huésped y generar resistencia al TAR (Kijak & McCutchan, 2005). La pérdida de susceptibilidad del virus por el uso incorrecto de fármacos antirretrovirales (resistencia adquirida) permite el progreso acelerado a fase de SIDA de la persona infectada, así como la transmisión de virus resistentes a otros individuos (resistencia transmitida), constituyendo una amenaza para la salud pública mundial, en Colombia se ha reportado al año 2016 una prevalencia de resistencia transmitida del VIH-1 general del 9,7% IC 95%(6,1-14,9) presentando mutaciones para los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos a los nucleósidos (ITIN) del 3,6% IC (1,6-7,5) y para los ITINN del 6,10% IC (3,3-10,7) (MINSALUD, 2016). Asimismo, aun cuando el TAR combinado y su adherencia son óptimos, algunas personas infectadas con el VIH-1 no consiguen mantener cargas virales indetectables debido a la persistencia de la inflamación, produciendo una viremia de bajo nivel residual persistente que oscila entre 1 a 5 copias de ARN viral x ml de plasma y que solo pueden ser detectadas utilizando ensayos moleculares ultrasensibles (Van Lint et al., 2013). Esto refuerza la necesidad de la genotipificación en el tratamiento del VIH y en la formulación de políticas públicas.

Según la ONUSIDA (El Programa Conjunto de Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA) al año 2016, 36.7 millones de personas viven en el mundo con VIH y 35 millones han fallecido desde el comienzo de la epidemia por causas relacionadas con el SIDA, con un descenso en el número de nuevos infectados del 35% en adultos y 58% en niños desde el año 2000, al igual que el número de muertes de un 42% desde su punto más alto en el año 2004, lo anterior atribuido entre otras intervenciones, al acceso a TAR de 18.2 millones de personas que viven con VIH al año 2016 (ONUSIDA, 2016). De esta manera, el mundo cumple el objetivo de desarrollo del milenio (ODM) 6 que hace referencia a revertir la propagación del VIH, evitando 30 millones

de nuevas infecciones y casi 8 millones de muertes relacionadas con sida desde el año 2000 (ONUSIDA, 2015).

Para los próximos 15 años como parte de los objetivos de desarrollo sostenible se ha determinado poner fin a la epidemia del SIDA para el año 2030. La primera estrategia es cumplir las metas 90' 90' 90' para el año 2020, es decir donde el 90% de la población que tiene VIH sea diagnosticada, el 90% de la población que requiere TAR lo reciba y el 90% de la población con TAR tenga cargas virales indetectables (ONUSIDA, 2015). Con referencia esta última meta, la OMS (Organización mundial de la salud) sugiere que cada país vigile la transmisión de fármaco resistencia del VIH-1 sirviendo de apoyo programático al cambio de recomendaciones establecidas para TAR, formulando como estrategias: el seguimiento a indicadores de atención relacionados con el tratamiento de los pacientes y también la realización de estudios de genotipificación en pacientes con y sin exposición al tratamiento (WHO, 2017b). En este contexto el monitoreo y encuestas nacionales de genotipificación son un línea de investigación necesaria para el cumplimiento de este objetivo.

1.2. Justificación

En Colombia, del año 1983 al 2016 se han notificado al SIVIGILA un total de 124.723 casos de infección por VIH/sida con un acumulado de 13 661 muertes (Cuellar, 2017). Sin embargo, según la cuenta de alto costo a enero del 2016 aproximadamente 73 465 personas viven con VIH en el país, de las cuales 71 076 se encuentran afiliadas al sistema de seguridad social, siendo la población económicamente activa de 20 a 55 años de edad la más afectada (CAC, 2017). En cuanto al acceso a TAR, se estima que el 91.5% de las personas de la población infectada que se encuentra dentro del régimen de seguridad social reciben TAR, en donde el sostenimiento del TAR en esquemas de primera línea es de tan solo del 54,7%, siendo la principal causa del cambio la intolerancia al fármaco, efectos adversos e interacciones con otros medicamentos (23,09%), seguido de la falla terapéutica virológica, clínica e inmunológica (7,27%) entre otras (CAC, 2017). A pesar del riesgo de generar poblaciones virales resistentes a los fármacos por la no continuidad del tratamiento, la prueba de genotipificación del VIH-1 que proporciona datos importantes con respecto a resistencia a los antiretrovirales y genotipos circulantes, fue practicada tan solo al 7,67% de la población con y sin tratamiento a pesar de encontrarse dentro del plan obligatorio de servicios de salud (POS) (CAC, 2017).

En países de bajos ingresos como Colombia, la oferta de laboratorios de diagnóstico que realizan genotipificación para VIH es muy baja debido a la

capacidad instalada y técnica que se necesita para realizarla, además del costo elevado del único estuche comercial disponible en el mundo (ViroSeq), diseñado y aprobado para el estudio del genotipo B del VIH-1, disminuyendo su sensibilidad ante las variantes del VIH-1 de genotipo NO B y formas recombinantes circulantes (Inzaule et al., 2013). Igualmente en Colombia el único laboratorio de Vigilancia en Salud Pública con capacidad instalada para genotipificación es el Instituto Nacional de Salud, sin embargo no se cuenta con implementación de técnicas para este procedimiento con el VIH. Es decir que para lograr una cobertura de la genotipificación en Colombia dado sus múltiples zonas de difícil acceso geográfico es necesario buscar soluciones viables tanto en la técnica a utilizar como en otros factores como el transporte y conservación de muestras.

Por lo tanto es importante resaltar que la falta de metodologías estandarizadas para la recolección, manipulación y análisis de las muestras dificultan la obtención de resultados confiables en calidad y cantidad así como también una adecuada interpretación de resultados de farmacoresistencia del VIH-1 a fármacos inhibidores de la proteasa y transcriptasa inversa y la aplicación de esta información a las acciones en salud pública para evaluar de manera precisa la magnitud de la resistencia adquirida y transmitida del VIH-1 a nivel nacional (WHO, 2010). El análisis de la otra región del gen *pol* del VIH-1 como lo es el que codifica para la integrasa, no es objeto de este estudio aunque a mediano plazo podría ser incluido, ya que si bien es cierto que el uso de fármacos inhibidores de la integrasa en Colombia no se encuentra dentro de las opciones de tratamiento de primera y segunda línea (ACIN, 2014), si está recomendado en pacientes que presentan falla virológica o de primera línea en personas con alto riesgo de toxicidad e intolerancia a los inhibidores de la transcriptasa inversa.

Por lo anterior, el actual proyecto de investigación busca desarrollar una técnica *in-house* que identifique genotipos y patrones de resistencia a los antiretrovirales del VIH-1, cumpliendo con estándares de calidad establecidos a nivel internacional por la OMS, disponible para generar datos confiables acerca resistencia del virus a los antirretrovirales en Colombia. Esta técnica busca:

- Usar de mayor número de matrices diferentes al plasma, como las gotas de sangre seca en papel filtro, lo cual permitirá el transporte y conservación en zonas de difícil acceso geográfico.
- Disminuir significativamente el costo en los reactivos, lo cual permitiría que el Estado Colombiano lograra una mejor cobertura en la monitorización de resistencia transmitida y adquirida a antiretrovirales para VIH-1.

- Genotipificar varios subtipos de VIH-1 del grupo M, que corresponde aproximadamente a más del 80% de los casos e identificar cepas recombinantes.
- Proyectar estudios viables enfocados a definir perfiles de resistencia antiretroviral y así definir políticas públicas basadas en realidades epidemiológicas locales.

2. MARCO TEORICO

2.1. Generalidades VIH/SIDA

2.1.1. Clasificación taxonómica

En el año 1984, fue secuenciado el primer virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y se denominó HTLV-III, al año 1992 se conocían dos tipos de VIH con una considerable diversidad genética (B. T. Foley et al., 2016). Actualmente el virus de la Inmudeficiencia Humana, se clasifica dentro de la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* y género *Lentivirus*. Se conocen dos especies capaces de infectar a los humanos: el Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (VIH-1) y Virus de la Inmunodeficiencia Humana 2 (VIH-2) (ICTV, 2015).

2.1.2. Clasificación filogenética

El VIH tipo 1 y 2 provienen de dos SIV (virus de inmunodeficiencia simiana) genéticamente distintos por eventos zoonóticos independientes. Habitan diferentes huéspedes naturales: el VIH-1 proviene del SIVcpz que afecta a los chimpancés mientras el VIH-2 proviene de los SIVs que afecta a los monos Mangabeys de hollín. El SIVcpz es una quimera del gen *pol* del SIV que afecta a los simios Mangabeis y el gen ENV del SIV que infecta al resto de los monos (Motomura, 2008). A pesar de que el VIH-1 y el VIH-2 tienen estructuras genéticas similares muestran una variación de secuencias significativa, con una similitud de tan solo el 55% de la secuencia de nucleótidos y el 54%, 55% y 35% de similitud en la secuencia de aminoácidos en el gen gag, *pol* y env respectivamente (Motomura, 2008).

Para el caso del VIH-1 se han identificado 4 grupos: M, N, O y P. El M y N estrechamente relacionados a los encontrados a los chimpancés salvajes de los Traglodytes del Pan troglodytes, sub especies del sudeste de Camerún. Al VIH-1 del grupo M se le ha atribuido la pandemia del SIDA (B. T. Foley et

al., 2016). Los virus VIH-1 O y P están estrechamente relacionados con los encontrados en gorilas de las tierras surorientales de Camerún. (B. T. Foley et al., 2016).

El VIH-1 del grupo M es el responsable del 85% del total de infectados en el mundo (Martin et al., 2016) y está dividido en nueve subtipos A, B,C,D,F,G,H,J,K (NSA-2, 2012) con una diferencia en la secuencia de aminoácidos de hasta un 35% (B. T. Foley et al., 2016; Gall et al., 2012). Dado a que en un comienzo el compendio de datos pertenecían a secuencias de la cápside (gen *gag*), en el año 1992 se publicó la primera clasificación de los subtipos A al D. Más adelante con las secuencias de los genes de la envoltura (gen *env*) se determinó el subtipo E, sin embargo por su similitud con el gen *gag* del subtipo A, el subtipo E se considera actualmente como una variante de dicho subtipo. En 1994 se detectó el subtipo F en Brasil junto con la variante B/F, así como también el subtipo G. Al año 2000 ya se habían descrito los subtipos H, J y K. A pesar de tener regiones únicas que posiblemente justificaban un nuevo subtipo, el subtipo I fue renombrado como forma recombinante, ya que varias regiones de su genoma eran similares a clones de los subtipos del A al H (Kijak & McCutchan, 2005). La secuencia de genomas completos del VIH-1 con formas recombinantes únicas podrían sugerir la existencia de otros subtipos(B. T. Foley et al., 2016). Estudios recientes sugieren que los subtipos del VIH-1 difieren entre sí con respecto a los niveles de carga viral, la progresión de la enfermedad, la afinidad con los receptores de quimioquinas, las tasas de transmisión vertical y los niveles de activación transcripcional (Blackard, Cohen, & Mayer, 2002).

Actualmente se conocen ocho subsubtipos, 6 clados del subtipo A (A1, A2, A3, A4, A5, A6) y dos clados del subtipo F (F1 y F2), con una diferencia en la secuencia de aminoácidos entre subsubtipos hasta del 20%(B. T. Foley et al., 2016; Gall et al., 2012; NSA-2, 2012). Al 2016, se han reportado 90 formas recombinantes intra-subtipos y subsubtipos del VIH-1, las cuales se nombran con el sufijo CRF seguido por el número consecutivo a su reporte y las letras que refieren de los subtipos o subsubtipos que se han recombinado como se puede observar a continuación (Alamos, 2017; B. T. Foley et al., 2016; Jia et al., 2016).

Tabla 1. Formas recombinantes circulantes del VIH-1 grupo M reportadas hasta el año 2017.

Nombre	Secuencia de referencia	Subtipos	Nombre	Secuencia de referencia	Subtipos
CRF01_AE	CM240	A, E	CRF46_BF	01BR087	B, F1
CRF02_AG	IbNG	A, G	CRF47_BF	P1942	B, F1
CRF03_AB	Ka153	A, B	CRF48_01B	07MYKT014	CRF01, B
CRF04_cpx	94CY032	A, G, H, K, U	CRF49_cpx	N28353	A1, C, J, K, U
CRF05_DF	VI1310	D, F	CRF50_A1D	8179	A1, D
CRF06_cpx	BFP90	A, G, J, K	CRF51_01B	HM021	CRF01, B
CRF07_BC	97CN54	B', C	CRF52_01B	M043	CRF01, B
CRF08_BC	97CNGX-6F	B', C	CRF53_01B	11FIR164	CRF01, B
CRF10_CD	TZBF061	C, D	CRF55_01B	HNCS102056	CRF01, B
CRF11_cpx	GR17	A, E, G, J, U	CRF56_cpx	URF5	CRF02, B, G
CRF12_BF	ARMA159	B, F1	CRF57_BC	1439	B, C
CRF13_cpx	96CM-1849	CRF01, A, G, J, U	CRF58_01B	09MYPR37	CRF01, B
CRF14_BG	X397	B, G	CRF59_01B	09LNA423	CRF01, B
CRF15_01B	99TH.MU2079	CRF01, B	CRF60_BC	BAV499	B, C
CRF16_A2D	97KR004	A2, D	CRF61_BC	JL100010	B, C
CRF17_BF	ARMA038	B, F1	CRF62_BC	YNFL13	B, C
CRF18_cpx	CU76	A1, F, G, H, K, U	CRF63_02A1	10RU6637	CRF02, A1
CRF19_cpx	CU7	A1, D, G	CRF64_BC	YNFL31	B, C
CRF20_BG	Cu103	B, G	CRF65_cpx	YNFL05	CRF01, B, C
CRF21_A2D	99KE_KER2003	A2, D	CRF66		
CRF22_01A1	02CMLT72	CRF01, A1	CRF67_01B	MAS59	CRF01, B
CRF23_BG	CB118	B, G	CRF68_01B	XC46	CRF01, B
CRF24_BG	CB378	B, G	CRF69_01B	10JP-5091N200	CRF01, B
CRF25_cpx	02CM_1918LE	A, G, U	CRF70_BF	PE004	B, F1
CRF26_AU	02CD_MBTB047	A, U	CRF71_BF	PE008	B, F1
CRF27_cpx	04FR-KZS	A, E, G, H, J, K, U	CRF72_BF	MG002	B, F1
CRF28_BF	BREPM12609	B, F1	CRF73_BG	9196_01	B, G
CRF29_BF	BREPM16704	B, F1	CRF74_01B	10MYPR268	CRF01, B

CRF30_0206	00NE36	CRF02, CRF06	CRF75		
CRF31_BC	04BR142	B, C	CRF76_01B	N628	CRF01, B
CRF32_06A1	EE0369	CRF06, A1	CRF77		
CRF33_01B	05MYKL007	CRF01, B	CRF78_cpx	YNTC19	CRF01, B, C
CRF34_01B	OUR2275P	CRF01, B	CRF79		
CRF35_AD	AF095	A, D	CRF80		
CRF36_cpx	NYU830	CRF01, CRF02, A, G	CRF81		
CRF37_cpx	NYU926	CRF01, CRF02, A, G, U	CRF82		
CRF38_BF	UY03_3389	B, F1	CRF83		
CRF39_BF	03BRRJ103	B, F1	CRF84		
CRF40_BF	05BRRJ055	B, F1	CRF85_BC	SC143	B, C
CRF41_CD	CO6650V1	C, D	CRF86_BC	15YNHS18	B, C
CRF42_BF	luBF_13_05	B, F1	CRF87_cpx	DH32	CRF01, B, C
CRF43_02G	J11223	CRF02, G	CRF88_BC	05YNRL25	
CRF44_BF	CH80	B, F1	CRF89		
CRF45_cpx	04FR.AKU	A, K, U	CRF90	BRGO6043	B, F1

Tomado de(Alamos, 2017).

2.1.3. Estructura del virión

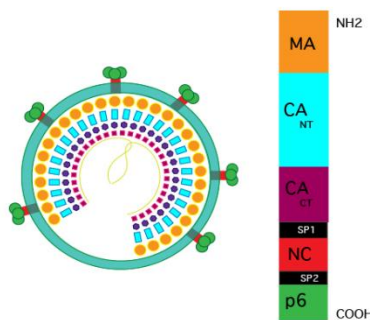
El VIH-1 es un virus esférico de aproximadamente 130 nm de diámetro (Ganser-Pornillos, Yeager, & Sundquist, 2008). Posee una envoltura lipídica procedente de la membrana plasmática de la célula blanco de replicación en donde sobresalen espículas o picos formados por estructuras triméricas no covalentemente asociadas y son el producto principal del gen *env* del VIH conformadas por las subunidades gp41 y gp120 derivadas de la escisión proteolítica de la proteína precursora gp160 en el aparato de Golgi celular (Kramer V, 2015; Lee et al., 2015; Moseri et al., 2014). Estos picos o espículas consisten en tres dominios de superficie (SU, gp120), sobre tres dominios transmembrana (TM, gp41). La gp120 está formada por cinco regiones conservadas (C1-C5), las principales áreas de contacto con gp41 y 5 regiones o bucles variables (V1-V5) cumpliendo funciones específicas, V1, V2 y V3 protegen regiones conservadas de reconocimiento de anticuerpos; el bucle V3 adicionalmente determina el tropismo viral. La subunidad gp41 consiste en un extremo amino-terminal (N) y carboxi-terminal (C) que sufre

cambios conformacionales transitorios durante la etapa de fusión con el fin de formar un poro de entrada del virus a la célula (Morse, 2015; Roux & Taylor, 2007).

Al interior del virión la cápside alberga las proteínas de replicación (retrotranscriptasa (RT) e integrasa (IN)) así como también el ARN genómico viral (Engelman & Cherepanov, 2012). La forma de la cápside juega un papel importante en la diferenciación de los viriones maduros (forma del virus infecciosa) de los inmaduros (la forma del virus no infecciosa). En los viriones inmaduros, las proteínas de la cápside se encuentran dispuestas esféricamente con el fin de asociarse con la membrana interna de la célula huésped, mientras en el virión maduro las proteínas de la cápside se asocian en forma cónica y en algunas ocasiones en forma cilíndrica, probablemente asociado a la necesidad de liberarse fácilmente en el citoplasma de una nueva célula infectada (Ganser-Pornillos et al., 2008).

Todas las proteínas estructurales del VIH-1 se derivan de la poliproteína multidominio Gag, que una vez se integra a la membrana celular se escinde por acción de las proteasas virales activadas durante el ensamblaje del virión, formando un conjunto de nuevas proteínas y péptidos espaciadores (SP) denominados como MA, CA, SP1, NC, SP2 y p6 como se observa en la figura 1. (Briggs & Krausslich, 2011).

Figura 1. Estructura de la poliproteína Gag del VIH-1, muestra las ubicaciones de MA, CANTD, CACTD, SP1, NC, SP2, Y p6.



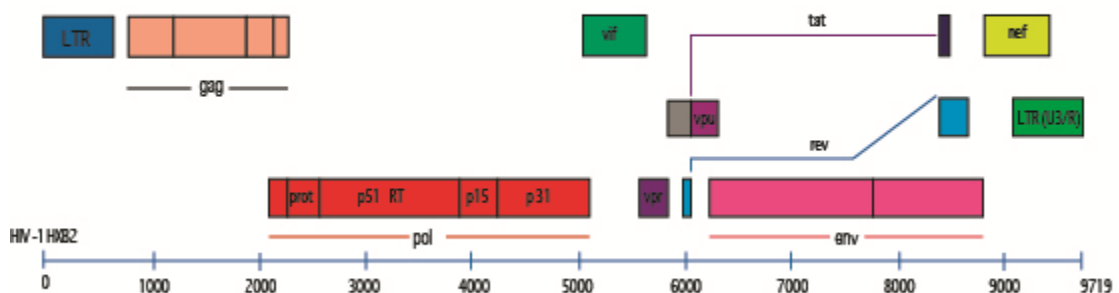
Fuente: elaboración propia

2.1.1 Organización del genoma viral

El genoma del VIH-1 está constituido por una hebra sencilla de ARN sentido positivo con un tamaño aproximado de 10000 pb. En las partículas virales se encuentran dos hebras idénticas en forma dimérica con uniones no covalentes entre ellas susceptibles a su disociación por calor (Sakuragi, Yokoyama, Shioda, Sato, & Sakuragi, 2016).

El genoma del VIH-1 posee en cada uno de sus extremos 5' y 3' una región larga repetida terminal del inglés Long terminal repeat (LTR) (Vemula et al., 2015), que contiene tres regiones U5, R y U3. La LTR sirve para iniciar la expresión de los genes virales a través de procesos complejos que requieren la intervención de la encima ARN polimerasa II celular, así como factores de transcripción tales como el SPL y NF-KB. Contienen varios elementos reguladores característicos: Una secuencia TATA, regiones de unión a los factores de transcripción, un elemento regulador negativo (ERN) situado en el extremo 5' de U3, una secuencia de respuesta que actúa en trans y una señal de poliadenilación (Mitsuya, Yarchoan, & Broder, 1990; Vemula et al., 2015). Está organizado en tres marcos de lectura abierto (ORF) y codifica para tres genes principales en su orden 5'-gag-pol-env-3', además de una serie de genes encargados del acceso y regulación de las proteínas virales dentro de la célula huésped, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* y *nef* (Menendez-Arias, 2013) figura 2.

Figura 2. La organización del genoma del VIH-1 y la estructura de RT.



Fuente: elaboración propia

A continuación se describen las proteínas que codifican cada uno de los genes del VIH-1 y su función principal.

Tabla 2. Proteínas del VIH-1 y su función

Nombre		Tamaño	Función	Localización
Gag	MA	p17	Proteína miristilada de la matriz (MA) Anclaje de la membrana, transporte al núcleo	Virión
	CA	p24	Proteína de la cápside	Virión
	NC	p7	Proteína de la nucleocápside (NC), se une al ARN	Virión
		p6	Favorece la maduración del virus, se une a Vpr	Virión
Pol	Proteasa (PR)	p10	Clivaje y maduración del virión	Virión
	Transcriptasa inversa (TI)	p66, p51	Son las dos subunidades de la transcripción inversa	Virión
	Rnasa H	p15	RNasa H, presente en la subunidad p66 pero no en la 51.	Virión
	Integrasa (IN)	p32	Integración al ADN (provirus)	Virión
Env		gp120/gp41	Glicoproteína viral externa, unión al receptor y anclaje a la membrana celular	Envoltura y membrana del virión
Tat		p16/p14	Activador de la transcripción de todos los RNAm virales	Núcleo
rev		p19	Transporte del ARN m genómico y los ARNm parcialmente procesados mediante splicing del núcleo al citoplasma	Primero en el núcleo y luego en el citoplasma
Vif		p23	Promotor de la maduración e infectividad	Citoplasma y membrana celular, virión
Vpr		p10-15	facilita la entrada del complejo de preintegración al núcleo y detiene el ciclo celular en G2	Núcleo Virión

Vpu	p16	Aumenta la liberación de viriones de la célula infectada. Interviene en la degradación CD4 en el retículo endoplasmático	Proteína integral de la membrana celular
Nef	p27-p25	Regula negativamente la expresión CD4 y el CMH-1	Membrana plasmática y citoplasma celular

Tomado de .(B. T. Foley, Apetrei,C.,Mizrachi, I., Rambaut, A.,Korber, B., Leitner,T.,Hahn,B.,Mullins,J.,Wolinsky,S., 2016).

2.1.4. Ciclo de replicación del VIH-1

El VIH-1 tiene tropismo por las células que pertenecen al cluster de diferenciación CD4⁺, una molécula de 55 Kd que se expresa en la superficie de algunas células, siendo las más susceptibles de infectarse, las células T, Macrófagos, células de Langerhans y células mieloides dendríticas (Gummuluru, Pina Ramirez, & Akiyama, 2014; Morse, 2015). Además del CD4 también los co-receptores de quimioquinas responsables de la activación inmune y quimiotaxis linfocitaria, expresado en células T, monocitos, macrófagos y células dendríticas juegan un papel importante durante la infección por VIH. El correceptor CCR5 conocido como CD195 o correceptor de tropismo-macrófago (M-Trópico), predomina durante la infección temprana, mientras que el co-receptor de la línea de células T trópico (T-Trópico) CXCR4 predomina durante las etapas posteriores de la primoinfección, el CCR2 de linfocitos T CD4 y monocitos humanos y el CCR3 de células de la microglía del SNC, actúan como correceptores en menor proporción (Lucic & Lusic, 2016; Morse, 2015). El ciclo de replicación del VIH-1 se divide en diferentes etapas que se describen a continuación:

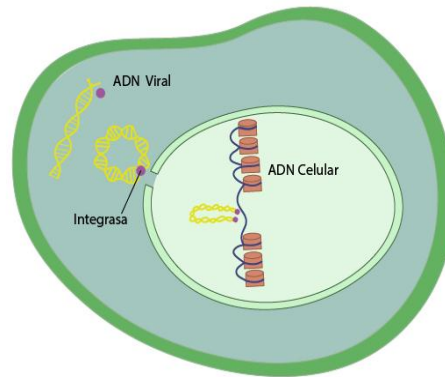
1. **Entrada del virus a la célula:** este proceso se produce aproximadamente de 1 a 3 horas después de la exposición de las células al virus(Holmes, Zhang, & Bieniasz, 2015). El receptor CD4 interactúa con la proteína viral gp120 promoviendo la unión a los correceptores CCR5 y CXCR4 involucrados en la entrada del VIH-1 en la célula huésped (Poveda, 2015). La interacción entre el receptor celular y la gp120 viral, induce la formación de una lámina puente entre los dominios internos y externos del monómero gp120, produciendo el reordenamiento en la estructura de la glicoproteína transmembrana gp41 fusionando la partícula viral a la membrana de la célula huésped (Engelman & Cherepanov, 2012).

2. **Transcripción inversa ARN viral:** Ocurre de 6 a 48 horas después de la entrada del virus a la célula huésped (Holmes et al., 2015). Tras la penetración del virus a la célula, la cápside es liberada en el citoplasma, en donde la transcripción inversa tiene lugar para convertir el ARN viral en ADN proviral. La retrotranscripción comienza mediante la unión del cebador tRNALys3 no aminoacilado (no cargado con un aminoácido) de la célula huésped al sitio de unión del primer (PBS) de ARN viral (Giroud et al., 2013; Zhao, Li, & Bukrinsky, 2011). La proteína Vpr se encarga de promover la incorporación del tRNALys3, ya que se une a la enzima Lys-ARN sintetasa inhibiendo su actividad de aminoacilar tRNALys3 (Zhao et al., 2011). La elongación durante la retrotranscripción es catalizada por la enzima retrotranscriptasa inversa (RT) formada por la subunidad p66 con actividad polimerasa de ARN dependiente de ADN y RNasaH, asociada con la subunidad p51 desprovista de actividad enzimática, sintetizando un fragmento de ADN sentido negativo ((-)ssDNA) con un tamaño de aproximado de 182 nucleótidos (Jacob & DeStefano, 2008) y luego esta plantilla se transfiere al extremo 3' del genoma. De esta manera la síntesis de la cadena de ADN negativa continúa con la degradación del ARN molde. La iniciación de la cadena complementaria inicia en un fragmento del genoma del ARN denominado tracto de polipurina (PPT, 5'-AAAAGAAAAGGGGGG), este fragmento del genoma del ARN no se degrada por acción de la RNasaH durante la síntesis de la cadena negativa (Jacob & DeStefano, 2008).

3. **Integración del ADN proviral al genoma celular:** Ocurre 5 horas después de terminada la transcripción inversa (Holmes et al., 2015). Tanto las proteínas víricas como celulares se asocian con al ADN proviral de doble cadena denominado complejo de preintegración (CPI) formado por la proteína de la matriz (MA), las enzimas transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN) y la proteína accesoria Vpr (Laith, 2007). Este complejo se transfiere al núcleo gracias a la enzima viral integrasa (IN), quien además cataliza la reacción de integración en la cromatina celular (ver figura 3) (Lucic & Lusic, 2016). A diferencia de otros retrovirus, los Lentivirus pueden importar ADN viral al núcleo de la célula intacto a través de los poros nucleares (PNC), dado que CPI tiene un tamaño aproximado de 56 nm de diámetro y el poro nuclear de 25 nm, su importación nuclear está mediada por señales de localización nuclear (SLN), a través de proteínas con correceptores de desplazamiento núcleo-citoplasma que pertenecen a la familia de las importinas o Karioferinas β , la integrasa es considerado un SLN no clásico (Suzuki & Craigie, 2007). Por otro lado la proteína Vpr se ha encontrado interactuando directamente con los componentes del PNC,

tales como las importinas α y la Nucleoporina hCG1 aumentando la eficiencia de la importación de ADN viral al núcleo (Nisole & Saib, 2004; Suzuki & Craigie, 2007).

Figura 3. Integración del genoma del VIH-1 al genoma celular.



Fuente: elaboración propia.

Varios estudios sugieren que la integrasa es un factor determinante del lugar de integración, ya que esta proteína puede acoplarse a los cromosomas mitóticos en ausencia del genoma u otras proteínas virales. La enzima IN es un miembro de la superfamilia D, D(35)E transposasa mediadoras de la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped (Laith, 2007).

4. Transcripción del ARNm viral:

La transcripción del ADN proviral del VIH-1 genera un transcrito de 9Kb y posteriormente se procesa a través de splicing alternativo en más de 40 mARN y se dividen en tres clases: 1) mARN sin cortar de 9Kb que codifica Gag, gag-pol; 2) mARN individual (SS) de un tamaño aproximado a 4Kb que sintetizan las proteínas Vif, Vpr, Vpu y env; 3) mARN múltiple (MS), de aproximadamente 1.8 Kb que sintetizan Tat, Rev y Nef (Loret, Georgel, Johnson, & Ho, 1992). Este proceso de transcripción es realizado por la maquinaria de la célula huésped impulsado por la proteína viral Tat. A través del estímulo de activación linfocitaria inducida por NF- κ B, Sp1 y el factor TFIID (Vlach et al., 1995), el promotor del VIH-1 localizado en U3 de la región 5' del LTR produce pequeñas cantidades de Tat, iniciando un ciclo de retroalimentación positiva estimulando la transcripción viral. Tat recluta el promotor del VIH-1 y activa el factor de elongación positiva de la transcripción P-TEFb, que consiste en un complejo entre ciclina T1 y Cdk9.

Tat se une a la ciclina T1 y a la región que responde a la activación de trans, un ARN presente en el extremo 5' de todos los transcritos virales. Esta induce la formación de un complejo terciario en los ARN nacientes, que permite a Cdk9 fosforilar varios componentes de la maquinaria de transcripción, incluyendo el dominio terminal C (DTC) de la subunidad de ARN polimerasa (ARNPII), los factores de elongación DSif y el factor de elongación negativa (FELN), activando de forma potente a ARNPII, de manera que pueda transcribir todo el genoma viral. La producción del mRNA mensajero de VIH se regula a nivel de transcripción, splicing y la poliadenilación el VIH-1 en cada de los LTR (Boireau et al., 2007).

5. Traducción y síntesis de proteínas

Inmediatamente después de la transcripción, el mRNA sufre un proceso de maduración formando una caperuza en el extremo 5' con la inserción de una 7-metilguanosa (m7G) y poliadenilando el extremo 3'. El m7G es reconocido por el complejo de unión a la caperuza (CBC) compuestas por las proteínas de unión 80 y 20 (CBP 80/20). Luego del splicing, las moléculas maduras de mRNA son cargadas al complejo de unión exón-exón (EJC) y las proteínas SR, con esta unión le permiten al heterodímero NXF1/NXT1 exportar el mRNA al citoplasma celular a través de los poros nucleares (Guerrero et al., 2015).

En el citoplasma el mRNAs pierde la caperuza de m7G adquiriendo una estructura de bucle cerrado y se activan a través de factores de iniciación eucariota 4F (compuesto por eIF4E, eIF4G y eIF4A) y EIF4B, que mediante la unión de la proteína de unión a poly A (PABP) forman el complejo de preiniciación (CPI) de la traducción de las proteínas virales (Guerrero et al., 2015).

Algunas proteínas virales inhiben diferentes factores de traducción celular, es el caso de la proteasa viral que escinde el factor IF4G, eIF3d y el PABP degradándolos; Nef que interactúa con eEF1A previniendo la apoptosis inducida por el estrés en los macrófagos primarios y Vif que contrarresta la acción de APOBEC3G (enzima de edición de ARNm de poliproteína B, 3G de tipo polipéptido catalítico o A3G), un factor de restricción que afecta la replicación del VIH-1 inhibiendo la traducción A3G (Guerrero et al., 2015).

6. Ensamblaje de las nuevas partícula virales

Esta etapa comienza con la síntesis de la poliproteína Gag en el citosol y su traslado a la membrana celular en donde el dominio MA de Gag juega un papel importante en su orientación hacia la membrana. Gag induce el

reclutamiento y coalescencia del colesterol formando balsas lipídicas que probablemente permiten el ensamblaje y facilitan la incorporación de las glicoproteínas virales Env. Durante su traslado, el dominio NC de Gag interactúa con el ARN dimérico viral, el cual es la unidad de reconocimiento para el ensamblaje mediante la unión de una señal de empaquetamiento a menudo denominado el elemento ψ y está situado cerca del extremo 5' del ARN genómico (UTR). Después de la llegada a la membrana plasmática la proteína Gag, el genoma completo viral y el precursor Gag-Pol forman la partícula viral inmadura, Gag se alinea y empaqueta radialmente con el dominio MA orientado hacia la membrana viral y el C hacia el centro junto con el ARN genómico viral, esto permite acomodar la curvatura necesaria para formar una partícula con un diámetro de 120 nm, el tamaño del virión VIH-1 inmaduro. Para la incorporación de las proteínas Env se han sugerido interacciones entre el dominio MA de Gag y la cola citoplasmática de gp41 (Freed, 2015).

7. Maduración y salida de los viriones al medio extracelular

Después del ensamblaje de la red Gag inmadura en la membrana plasmática, la partícula naciente se libera al espacio extracelular a través de la maquinaria celular ESCRT involucrada en el brote de vesículas, citoquinesis y virus, secuestrada por Gag antes de salir de la célula, la proteasa viral escinde una serie de sitios tanto Gag como de GagPol, que tras la liberación de los dominios individuales de Gag, la región CA se reestructura para formar el núcleo cónico de la cápside (Freed, 2015).

2.2. Tratamiento Antiretroviral

Debido a los enormes avances en el conocimiento de la estructura y el ciclo de replicación del VIH-1 (Morse, 2015), desde 1996 se ha desarrollado más de treinta agentes antiretrovirales para combatir su infección, lo que ha permitido generar esquemas de combinación efectiva generando tratamientos antirretrovirales de gran actividad (TARGA) en las personas infectadas (Aids Study Group of the Spanish Society of Infectious Diseases, 2016; Morse, 2015). El tratamiento antirretroviral (TARV) suprime la replicación del virus y retrasa la progresión de la infección con el VIH particularmente cuando se administra durante la primera etapa de la infección. Los pacientes con TARV presentan bajos niveles de viremia plasmática por debajo del límite de detección durante 6 meses (Morse, 2015).

2.2.1. Clases de medicamentos antiretrovirales

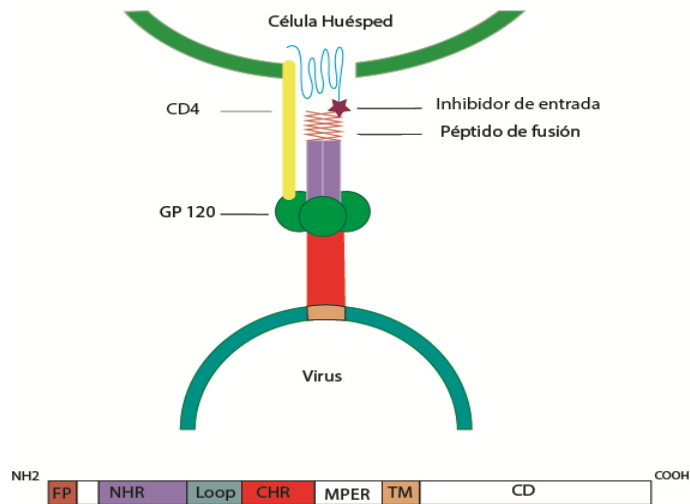
La administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA) reconoce y aprueba seis clases de medicamentos antiretrovirales contra el VIH: (i) inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (NRTI), (ii) inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTI), (iii) inhibidores de la proteasa (IP), (iv) inhibidores de fusión, (v) inhibidores de la entrada, y (vi) inhibidores de la integrasa (Allen & Rizzo, 2012).

2.2.1.1. Inhibidores de entrada

La molécula CD4 está formada por cuatro dominios D1, D2, D3 y D4, en donde D1 se une al dominio V3 de gp120, una región altamente conservada y cuya composición de aminoácidos determina el tropismo específico con uno de los dos co-receptores CCR5 o CXCR4 (Antell et al., 2016). Estos correceptores son proteínas con seis bucles en el extremo amino-terminal extracelular y seis bucles en el extremo C-terminal. Los virus que interactúan con CXCR4 se cargan positivamente en los aminoácidos 11,24 y 25 del bucle V3, una vez gp120 se une al correceptor ocurre un cambio conformacional que le permite llevar a cabo el proceso de fusión a la gp41 (Kramer V, 2015)

Los fármacos inhibidores de entrada del virus a la célula consisten en una serie de agentes antivirales que pueden actuar en puntos de la cascada de entrada tales como, unión a CD4, unión a los co-receptor CXCR4 y CCR5 y la fusión de membrana, sin embargo la alteración de la función inmunológica del receptor CD4 y el correceptor CXCR4 independiente a la infección por el VIH, no ha permitido su uso como blanco terapéutico. Del co-receptor CCR5 aún no se conoce con profundidad los efectos secundarios graves que puede generar su bloqueo. Es así como en la Actualidad el único inhibidor de entrada autorizado desde agosto de 2007 por la FDA (Food and drug administration USA) es el Maraviroc (MVC) que impide que los virus con tropismo CCR5 infecten una célula diana siendo el único antiretroviral que ejerce sus propiedades sobre un objetivo celular en lugar de un blanco viral; se une a una cavidad transmembrana formada por 7 hélices (proteína G) distinta al sitio de unión de gp120, induciendo a un cambio conformacional del correceptor inhabilitando la entrada del virus a la célula (ver Figura 4) (Kramer V, 2015).

Figura 4. Mecanismo de inhibición de la entrada del VIH-1 a la célula.



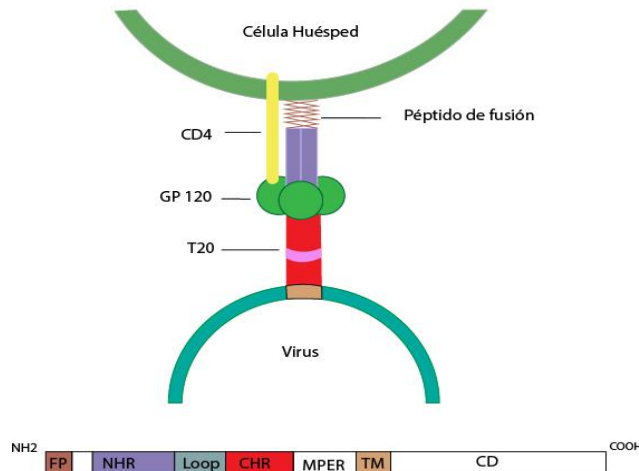
Fuente: Elaboración propia

2.2.1.2. Inhibidores de fusión

La fusión del virus a la célula huésped ocurre gracias a la activación fusogénica de la glicoproteína gp41, este proceso avanza a través de cuatro estadios conformacionales distintos: (i) Nativo, (ii) intermedio pre-horquilla, (iii) activación de la fusión (fusogénico) y (iv) fusión. En el estado intermedio pre-horquilla se exponen transitoriamente los dominios de repetición heptadina (patrón de repetición de siete aminoácidos) N-terminal (NHR) y C-terminal (CHR) de gp41, siendo el NHR quien se inserta en la membrana de la célula huésped. Posteriormente la formación de un paquete de seis hélices (6-HB) impulsa a la membrana viral y celular a fusionarse (Allen & Rizzo, 2012; Chong, Wu, Su, & He, 2016).

El único fármaco inhibidor de fusión aprobado por la FDA desde el 13 de marzo del 2003, es el péptido de 36 aminoácidos idéntico en secuencia a los aminoácidos de la región 127 a 152 CHR de la gp41 llamado T20 (Fuzeon o Enfuvirtida). El estado pre-horquilla es de particular interés en la producción de fármacos antivirales, ya que la región NHR es altamente conservada y se encuentra expuesta de manera transitoria durante la fusión. El péptido T20 se une al NHR, bloqueando la formación del paquete de seis hélices y por lo tanto inhibe la transición al estado fusogénico (Ver figura 5) (Allen & Rizzo, 2012).

Figura 5. Acción de los inhibidores de fusión del VIH-1 a la membrana celular.



Fuente: Elaboración propia

2.2.1.3. Inhibidores de la transcriptasa

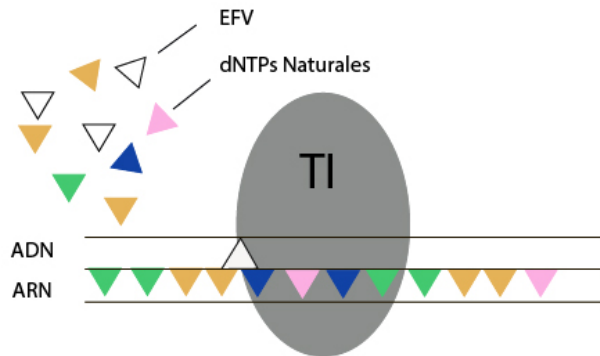
La transcripción inversa es el proceso mediante el cual el ARN monocatenario viral que entra al citoplasma celular se convierte en ADN híbrido (ARN-ADN) de doble cadena (Sonar et al., 2017). Este proceso ocurre mediante la acción de la enzima multifuncional transcriptasa inversa (RT), un heterodímero compuesto de subunidades p66 y p51 del gen *pol* del VIH, con p66 alberga dos sitios activos funcionales: una ADN polimerasa N-Terminal dependiente de ADN y ARN y una ADN polimerasa C-terminal ribonucleasa H (RNasaH) que digiere el componente ARN de híbridos de ARN/ADN (Engelman & Cherepanov, 2012; Famigliani & Silvestri, 2016). Actualmente existen dos clases de fármacos antivirales capaces de inhibir la retrotranscripción los nucleósidos y no nucleósidos (Engelman & Cherepanov, 2012).

i) Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (ITINN)

Los inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa inducen cambios conformacionales importantes en esta enzima, cuya finalidad es permitir el desplazamiento del sitio de agarre del cebador obstruyendo el sitio de unión de la enzima con los nucleósidos de origen natural (Famigliani & Silvestri, 2016; Morse, 2015), además de alterar su función catalítica produciendo un

déficit en la coordinación de los iones Mg^{2+} para fijar de los dNTPs impidiendo la elongación de la cadena de ADN viral creciente (ver figura 6) (Engelman & Cherepanov, 2012).

Figura 6. Acción que ejercen los inhibidores de la transcriptasa inversa NO análogos a nucleósidos.



Fuente: elaboración propia

Tabla 3. Fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa NO análogos a los nucleósidos aprobados por la FDA.

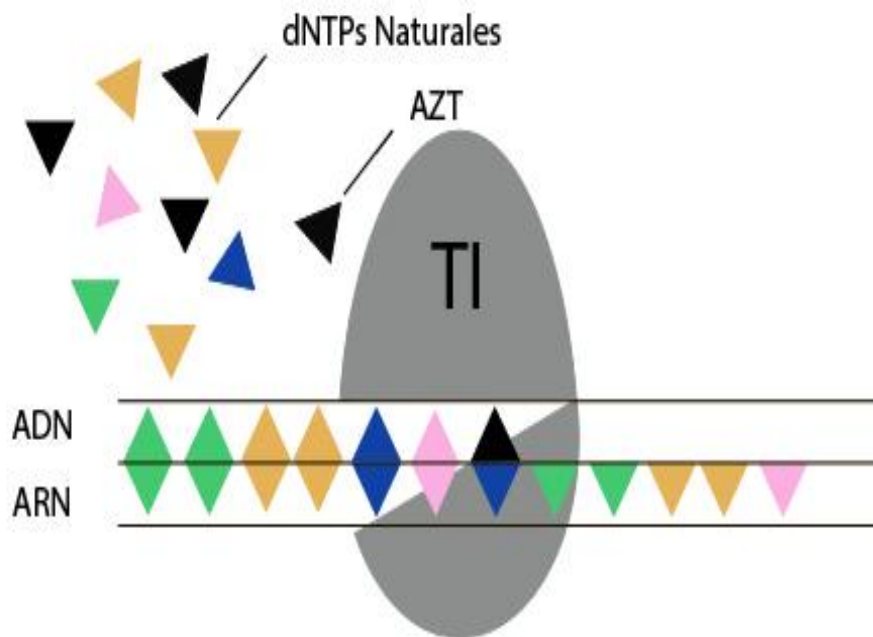
Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (ITINN)		
Nombre genérico (Otros nombres y siglas)	Marca comercial	Fecha de autorización por parte de la FDA
Efavirenz (EFV)	Sustiva	17 de septiembre del 1998
Etravirina (ETR)	Intence	18 de enero del 2008
Nevirapina (NVP)	Viramune	21 de junio del 1996
	Viramune XR (liberación lenta)	25 de marzo del 2011
Rilpivirina (clorhidrato de rilpivirina, RPV)	Eduvant	20 de mayo del 2011

Adaptado de (InfoSIDA, 2017)

i) Inhibidores Nucleósidos de la transcriptasa inversa (ITIN)

Los ITIN son moléculas análogas a los dNTPs naturales, sustrato normal de las enzimas ADN polimerasas y los cuales carecen del grupo 3'-OH actuando como un terminador de la síntesis de ADN (Engelman & Cherepanov, 2012). Los ITIN requieren de un proceso de fosforilación quinasa dependiente para su activación, una vez ocurre son capaces de inhibir la síntesis de ADN proviral compitiendo con los dNTPs de origen natural en el reconocimiento de la RT como sustrato y reduciendo actividad catalítica de la RT gracias a la ausencia del grupo 3-OH dando por terminado la síntesis de la cadena de ADN (ver figura 7) (Engelman & Cherepanov, 2012; Sluis-Cremer, Arion, & Parniak, 2000).

Figura 7. Acción que ejercen los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos a nucleósidos.



Fuente: elaboración propia

Tabla 4. Tabla Fármacos Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos a los nucleósidos aprobados por la FDA.

Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIN)		
Nombre genérico (Otros nombres y siglas)	Marca comercial	Fecha de autorización por parte de la FDA
Abacavir (sulfato de abacavir, ABC)	Ziagen	17 de diciembre del 1998
Didanosina (didanosina de liberación lenta, dideoxinosina, didanosina con revestimiento entérico, ddl, ddl EC)	Videx Videx EC (con revestimiento entérico)	9 de octubre del 1991 31 de octubre del 2000
Estavudina (d4T)	Zerit	24 de junio de 1994
Emtricitabina (FTC)	Emtriva	2 de julio del 2003
Lamivudina (3TC)	Epivir	17 de noviembre del 1995
(tenofovir DF, TDF)	Viread	26 de octubre del 2001
zidovudina (azidotimidina, AZT, ZDV)	Retrovir	19 de marzo del 1987

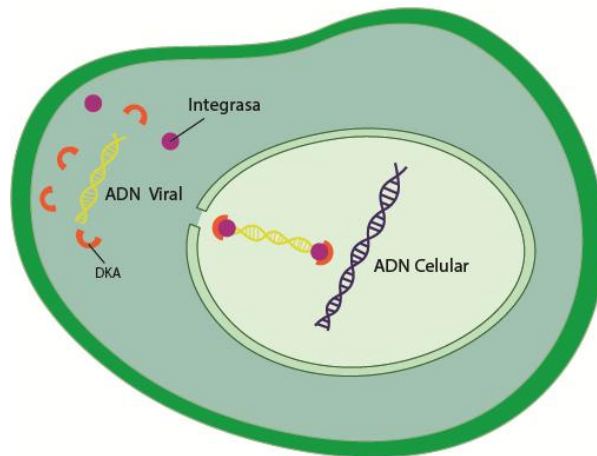
Adaptado de (InfoSIDA, 2017)

2.2.1.4. Inhibidores de la integración

La integrasa (IN) del VIH-1 es una proteína de 32 kDa codificada en el gen *pol* junto con la proteasa y la transcriptasa inversa (Dewdney, Wang, Kovari, Reiter, & Kovari, 2013), esta enzima cataliza dos sistemas de reacciones químicas espacial y temporalmente distintas, permitiendo la obtención de terminales 3'libres tanto en la cadena de ADN proviral como en el ADN cromosómico de la célula huésped y la transferencia de la hebra de ADN del citoplasma al núcleo (Engelman & Cherepanov, 2012; Engelman et al., 2013). Estas dos reacciones requieren la coordinación de **iones** divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) por una tríada catalítica de aminoácidos en las posiciones D64, D116 y E152 (Wainberg, Mesplede, & Quashie, 2012). Esta enzima es de gran interés para la búsqueda de tratamientos antivirales, ya que a diferencia de otras enzimas virales no tiene análogos celulares lo que evita afectar los procesos normales de la célula huésped (Agapkina et al., 2014). Los antivirales inhibidores de la integrasa actualmente aprobados son derivados de los ácidos aril-2,4-dicetobutanoicos (DKA), cuyo mecanismo de acción es

competir con el ADN sustrato de la integrasa viral durante la transferencia de la hebra de ADN viral (ver figura 8) (Morse, 2015)

Figura 8. El inhibidor de la integrasa Raltegravir tiene afinidad por la integrasa viral previniendo la fusión del ADN viral en el ADN cromosómico.



Fuente: elaboración propia

Tabla 5. Fármacos Inhibidores de la integrasa aprobados por la FDA

Inhibidores de la integrasa		
Nombre genérico (Otros nombres y siglas)	Marca comercial	Fecha de autorización por parte de la FDA
Dolutegravir (DTG)	Tivicay	13 de agosto del 2013
Elvitegravir (EGV)	Vitekta	24 de septiembre del 2014
Raltegravir (potasio de raltegravir, RAL)	Isentress	12 de octubre del 2007

Adaptado de (InfoSIDA, 2017)

2.2.1.5. Inhibidores de la proteasa

La proteasa de HIV-1 (PR) es una enzima aspartasa dimérica conformado por dos polipéptidos idénticos asociados por enlaces no covalentes. Cada monómero está compuesto de 99 aminoácidos con una secuencia conservada Asp-Thr-Gly en las posiciones 25-29, que proporciona un grupo aspartilo, necesario para ejecutar su actividad proteolítica. Esta enzima posee una hendidura hidrófoba de unión al sustrato, reconocida como el sitio activo enzimático, allí se reconoce y divide nueve secuencias diferentes de poliproteínas precursoras virales produciendo una estructura vírica madura y proteínas enzimáticas. Los inhibidores de la proteasa (IPs) del VIH-1 tienen una fuerte afinidad de unión a este sitio activo de la enzima proteasa viral, inhibiendo su actividad de una manera altamente selectiva y bloqueando la producción de virus infecciosos al inhibir el clivaje de las poliproteínas precursoras de partículas virales (Ammaranond & Sanguansittianan, 2012)

Tabla 6. Fármacos Inhibidores de la proteasa aprobados por la FDA.

Inhibidores de la Proteasa (IPs)		
Nombre genérico (Otros nombres y siglas)	Marca comercial	Fecha de autorización por parte de la FDA
Atazanavir (sulfato de atazanavir, ATV)	Reyataz	20 de junio del 2003
Darunavir (etanolato de darunavir, DRV)	Prezista	23 de junio del 2006
Fosamprenavir (fosamprenavir cálcico, FOS-APV, FPV)	Lexiva	20 de octubre del 2003
Indinavir (sulfato de indinavir, IDV)	Crixivan	13 de marzo del 1996
Nelfinavir (mesilato de nelfinavir, NFV)	Viracept	14 de marzo del 1997
Ritonavir (RTV)	Norvir	1 de marzo del 1996
Saquinavir (mesilato de saquinavir, SQV)	Invirase	6 de diciembre del 1995
Tipranavir (TPV)	Aptivus	22 de junio del 2005

Adaptado de (InfoSIDA, 2017)

2.2.2. Esquema de tratamiento antirretroviral en Colombia

Al año 2017, la principal indicación para el inicio de tratamiento antirretroviral en Colombia es el conteo de linfocitos T CD4+ menor a 500 células/mm³. En la guía de práctica clínica del ministerio de salud colombiano, la primera línea de tratamiento antirretroviral se formula en combinación entre inhibidores de la transcriptasa y/o inhibidores de la proteasa de la siguiente forma:

- Abacavir/Lamiduvina+ Efavirenz
- Abacavir/Lamiduvina+ Atazanavir y Ritonavir

Sin embargo, en la actualidad solo el 18,3% de las personas tratadas reciben este esquema como primera línea. Los esquemas de tratamiento aplicados como primera línea del 81% de personas restantes se ilustra en la tabla 7.

Tabla 7. Esquemas de tratamiento antirretroviral más usados en Colombia

Terapia antirretroviral actual	n	%
Abacavir + Lamiduvina + Efavirenz	13.527	18,3
Zidovudina + Lamiduvina + Efavirenz	8.396	11,4
Tenofovir + Emtricitabina+ Efavirenz	9.611	13,0
Zidovudina + Lamiduvina + Lopinavir/ Ritonavir	4.685	6,3
Abacavir + Lamiduvina + Lopinavir/ Ritonavir	5.185	7,0
Zidovudina + Lamiduvina + Neviparina	3.581	4,9
Abacavir + Lamiduvina + Atazanavir/ Ritonavir	3.941	5,3
Abacavir + Lamiduvina + Neviparina	2.732	3,7
Tenofovir + Emtricitabina+ Atazanavir/ Ritonavir	4.144	5,6
Tenofovir + Emtricitabina + Lopinavir/ Ritonavir	2.430	3,3
Tenofovir + Neviparina + Emtricitabina	1.242	1,7
Zidoduvina + Lamivudina +Atazanavir/ Ritonavir	988	1,3

Tomado de la cuenta de alto costo Colombiana (CAC, 2017).

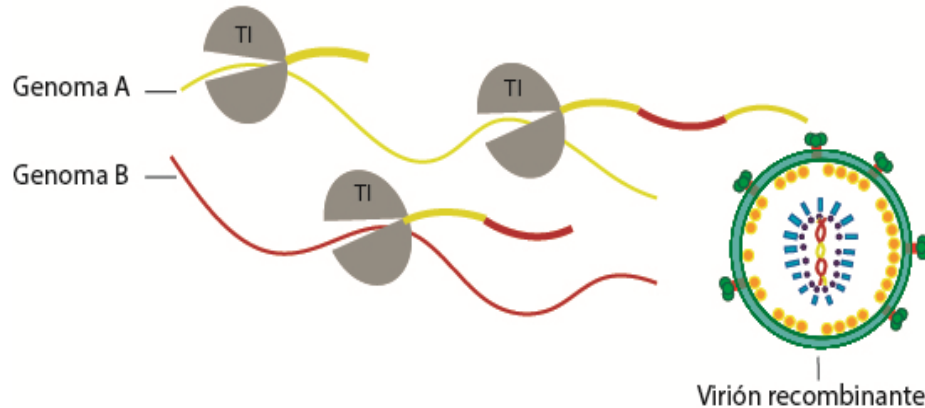
2.3. Variabilidad genética del virus.

Debido a los rápidos cambios genéticos in vivo VIH-1 ha permitido aislar un gran número de cepas diferentes en todo el mundo, evidenciado una alta tasa de mutación de 10^{-4} a 10^{-5} mutaciones de nucleótidos por ciclo de replicación junto a una elevada frecuencia de recombinación y producción de partículas virales (10^{10} por día) en pacientes no tratados, permitiendo que incluso en un mismo individuo existan diferentes cuasiespecies (Menendez-Arias, 2013). Se define como una cuasiespecie a una población de virus altamente relacionada pero genéticamente distintas dentro de un mismo individuo, revelando en los análisis de secuencias una variación sustancial de la información genética durante el curso de la infección (Jetzt et al., 2000). La variación genética del VIH puede afectar la exactitud de las pruebas diagnósticas y ensayos utilizados para cuantificar la carga viral, así como también son relevantes en desarrollo clínico de la infección y el diseño de vacunas (Blackard et al., 2002).

Esta variabilidad genética del VIH-1 se produce a través de cuatro mecanismos:

- a) **Errores introducidos por la Transcriptasa Inversa (TI) durante la polimerización del ADN proviral:** durante la retrotranscripción el VIH-1 puede introducir una mutación por ciclo de replicación (Kijak & McCutchan, 2005) por deleciones e inserciones de nucleótidos en el genoma viral, esto se debe a que la enzima transcriptasa inversa carece de actividad exonucleasa 3'-5' impidiendo la corrección durante la inserción de nucleótidos erróneos en la retrotranscripción (Jetzt et al., 2000; Zhuang et al., 2002).
- b) **Recombinación durante la transcripción inversa:** la presencia de dos hebras homologas de RNA viral en el citoplasma permite que la enzima transcriptasa inversa realice saltos intermoleculares en puntos calientes a lo largo del genoma durante el proceso de ADN de cadena negativa. En ensayos in vitro utilizando líneas celulares epiteliales o linfoides, se ha determinado que la TI del VIH-1 salta aproximadamente 3×10^{-4} nucleótidos o unas tres veces como promedio entre las dos hebras de ARN genómico en cada ciclo de replicación (Blackard et al., 2002; Jetzt et al., 2000; Najera, Delgado, Perez-Alvarez, & Thomson, 2002) (Figura 9).

Figura 9. Recombinación del genoma viral durante la transcripción inversa del ARN.



Fuente: elaboración propia

- c) **El tamaño de las poblaciones virales:** la infección de una misma célula por dos viriones genéticamente distintos, ya sea simultánea (coinfeción) o secuencialmente (superinfección) permite que dos ADNs provirales distintos se integren al ADN cromosómico, generando viriones heterocigotos por la encapsidación de dos hebras de ARN procedentes de viriones diferentes (Blackard et al., 2002; Najera et al., 2002)
- d) **Tiempo de replicación corto (turnover viral):** para la replicación viral se necesita la activación de los linfocitos T CD4+, sin embargo una vez ocurre, el proceso de replicación puede ser muy rápido y agresivo. En un ensayo basado en transfección de un plásmido que contiene el ADN proviral de VIH-1, se determinó que tras la activación linfocitaria, en 2 horas se produce la síntesis de las proteínas virales en la célula, detectándose 4 a 6 horas después viriones maduros en el medio de cultivo (Bermejo, Sanchez-Palomino, Usan, & Alcami, 2004; Jetzt et al., 2000).

2.4. Resistencia a los antiretrovirales

La resistencia de un microorganismo es una respuesta natural a la presión selectiva de un fármaco y el VIH no es la excepción frente a la terapia antiviral, en donde la supresión de la replicación viral no es completa permitiendo la aparición gradual de variables resistentes, causando el

fracaso virológico principalmente atribuido a la adherencia del paciente frente al tratamiento y/o a la baja potencia del régimen antirretroviral (Vella & Palmisano, 2005)

La resistencia del virus a los fármacos antirretrovirales depende de diversos factores tales como la barrera genética y la capacidad de selección de las cepas virales mutadas bajo la presión selectiva del fármaco administrado. La barrera genética se define como el número mínimo de mutaciones necesarias para superar la presión selectiva del fármaco y la capacidad de selección de cepas resistentes son factores independientes al virus inherentes de las condiciones ambientales tales como los de la célula huésped y biodisponibilidad¹ del fármaco que contribuyen a una “barrera de resistencia” más general (Menendez-Arias, 2013). El primer informe de resistencia del VIH-1 remonta al año 1989 en pacientes tratados con zidoduvina (AZT), desde entonces se ha documentado información de resistencia frente a cada una de las clases de fármacos antirretrovirales (Vella & Palmisano, 2005).

La resistencia a fármacos puede ser adquirida a través de la presión selectiva de fármacos o transmitida de persona a persona. La prevalencia de la resistencia a los medicamentos contra el VIH-1 para cualquier clase de fármaco antirretroviral se ha estimado en alrededor del 8-20% de la población no tratada (pacientes naive), recientes informes de estudios realizados en Europa y los EE.UU. Mostró una disminución durante la última década no obstante, esta disminución parece ser pequeña, en particular en la prevalencia de mutaciones de resistencia a los ITIN (Menendez-Arias, 2013).

2.4.1. Medición de la resistencia a los fármacos antirretrovirales (ARV)

Para realizar la prueba de resistencia del VIH-1 se pueden seguir dos enfoques diferentes:

- i. **Ensayos genotípicos**. En estos ensayos se obtiene la secuencia de nucleótidos de la región del gen *pol* que codifica para las enzimas virales transcriptasa inversa y proteasa del VIH, que posteriormente se compara con la secuencia del VIH-1 de tipo salvaje, con el fin de detectar mutaciones asociadas con resistencia a fármacos ITINs, ITINNs y IPs. Para fármacos inhibidores de la integrasa y de fusión, se deben analizar otras regiones del gen *Pol* y *env*, que codifican para la integrasa y gp41 viral respectivamente, sin embargo aún no se encuentran técnicas comerciales disponibles para tal fin. El resultado de los ensayos de genotipificación requieren su interpretación a través de algoritmos adecuados e interpretación experta (Vella & Palmisano, 2005).

Para la interpretación de esta técnica, el aminoácido de la cepa salvaje de VIH-1 siempre estará ubicada a la izquierda del número que indica la posición de dicho aminoácido y el aminoácido que resulta de la secuencia problema a la derecha del mismo (ej. N9009 K65R, K es el aminoácido de la cepa salvaje, 65 es su posición en la secuencia y R el aminoácido de la cepa problema (Stanford, 2017).

- ii. **Ensayos fenotípicos.** Estos ensayos miden la susceptibilidad a los antirretrovirales *in vitro* del VIH-1 plasmático de manera individual, comparando los cambios en la concentración inhibitoria (IC50) del fármaco frente a un virus de referencia de tipo salvaje (Vella & Palmisano, 2005).

A pesar de la diferencia de la información que proporciona cada uno de estos métodos, los ensayos genotípicos es el más utilizado en la práctica clínica, ya que es más “fácil” y menos costoso de ejecutar (Vella & Palmisano, 2005).

2.4.2. Clasificación e interpretación de mutaciones de fármaco resistencia

El sistema de puntuación de la base de datos de Stanford sobre la resistencia a los medicamentos contra el VIH-1 (HIVdb program) es el más utilizado por los clínicos para identificar las principales mutaciones de resistencia a los ITINs, ITINNs e IPs y caracterizar el nivel de resistencia en aislamientos clínicos. HIVDB tiene un programa de interpretación de resistencia genotípica en línea que acepta las secuencias de RT, PR y / o IN sometidas y como resultado se obtiene una lista de mutaciones de fármaco resistencia (DRM) obtenidos en la secuencia con puntuaciones que estiman el nivel de reducción de susceptibilidad frente cada fármaco antiretroviral (ARV). Los puntajes se basan en la sensibilidad y especificidad de una mutación con respecto a la presión y el efecto de la mutación sobre la susceptibilidad *in vitro* y la respuesta virológica a la terapia. Estos puntajes de los DRM son determinados por consenso de expertos en el tema como lo es el de IAS-USA a partir de la estimación de su importancia clínica. Un puntaje en HIVdb program de 15 a 29 predice una resistencia de bajo nivel; una puntuación de 30 a 59 predice resistencia intermedia y una puntuación de 60 o más predice una resistencia de alto nivel. Se denominan DRM principales a aquellos con puntaje de 30 o más para el caso de los ITINs e IPs porque generalmente la resistencia de alto nivel para estos fármacos resulta de la acumulación de múltiples DMR asociada a resistencia baja e intermedia, en cambio para los ITINNs son aquellas que tienen un puntaje de 60 o más (Rhee et al., 2015).

Las mutaciones reportadas para cada los ARV inhibidores de las enzimas virales (RT, PR e IN) que codifica el gen *pol* se resumen en la tabla 7. En HIVdb program de Stanford la sustitución de aminoácidos que confieren resistencia de alto nivel están representadas con letras rojas con resalto en negrilla, el de nivel intermedio con letras color negro con resalto en negrilla y las de bajo nivel con letras negras sin resalto (Stanford, 2017).

Tabla 8. Mecanismos de resistencia y principales mutaciones reportadas en el gen *pol* del VIH-1 que transcribe para las enzimas transcriptasa inversa, proteasa e integrasa.

Clase de Antiretroviral	Mecanismo de resistencia	Principales mutaciones reportadas	
Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (ITIN)	La baja fidelidad de a enzima RT y la alta tasa de replicación viral permiten mutaciones de resistencia a los ITINs tras la exposición a fármacos. Existen dos mecanismos bioquímicos de resistencia: el primero es la capacidad de la enzima RT de discriminar los ITIN durante la síntesis de ADN evitando su adicción y el segundo mediado por mutaciones que aumentan la tasa de eliminación fosforolítica de la cadena de ADN naciente que termina con el ITIN en el extremo 3', permitiendo la continuación de la síntesis de ADN. Estas mutaciones se encuentran cerca de la unión con los dNTP (sitio D67N y K70R) o próximo al sitio de unión con el cebador (T215Y/F y K219E).	Zidovudine (AZT)	M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E
		Didanosine (DDI)	K65R, L74VI, M184V, K70E, M41L, L210W, T215FY
		Estavudina(d 4T)	K65R, K70E, V75 T, M41L, D67N, K70R, W210T, T215Y/F
		Lamivudina (3TC)	K65R, M184V
		Abacavir (ABC)	M41L, K65R, L74V,
		Emtricitabine (FTC)	

		Tenofovir (TDF)	Y115F, M184V K65R, M184V K65R, K70E, Y115F, M41L, K70R, T210W, T215FY
Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (ITINN)	<p>Una sola mutación puede causar alta resistencia y pueden conferir resistencia cruzada entre todos los ITINN, estas mutaciones se encuentran cerca del bolsillo hidrófobo de unión al sustrato de la RT en las posiciones 98, 103, 106, 108, 181, 188, 190 y 236.</p> <p>K103N es la mutación de resistencia más común y confiere altos niveles de resistencia cruzada a los ITINN actualmente disponibles. Las mutaciones V106A, Y181C, y G190A se encuentran durante el fracaso virológico temprano. En estadios posteriores de la infección tratada se evidencian resistencia mediada por mutaciones múltiples (especialmente la combinación de Y181C y G190A). La mutación V179D confiere bajo nivel de resistencia a cada uno de los ITINNs, mientras que la mutación Y181 causa un alto nivel de resistencia a la nevirapina pero no al efavirenz.</p>	<p>Neviparina (NVP)</p> <p>Efavirenz (EFV)</p> <p>Etravirina (ETR)</p> <p>Rilvipirina (RPV)</p>	<p>L100I, K101EP, K103NS, V106AM, Y181CIV, Y188LCH, G190ASE, M230L</p> <p>L100I, K101EP, K103NS, V106AM, Y181CIV, Y188LCH, 230L</p> <p>L100I, K101EP, E138AGK Q, Y188CIV, Y188L, G190ASE, M230L</p> <p>L100I, K101EP, E138AGK Q, Y181CIV,</p>

			Y188L, G190ASE, M230L
Inhibidores de la proteasa	<p>La resistencia asociada con mutaciones en la proteasa está mediada por sustitución de aminoácidos en el sitio de unión al sustrato. Las mutaciones primarias como D30N, V82A y L90M ocurren en o cerca del sitio activo de la enzima, reduciendo de dos a cinco veces la susceptibilidad del virus a uno o más IPs. La mutación en el codón 82, V82A / T / F / S, ocurre en pacientes que reciben tratamiento con indinavir y ritonavir y se ha encontrado en aproximadamente el 1% de los individuos no tratados con subtipo B y en aproximadamente 5 - 10% de los individuos no tratado con subtipos no-B. En aislamientos con mutaciones N88D y L90M se encontró asociación de resistencia a siete IPs in vitro confirmando resistencia cruzada. Los polimorfismos en los codones 10, 20, 36, 63, 71, 77 y 93 se han descrito como secundarios que usualmente compensan la pérdida de la función enzimática y los efectos deletéreos inducidos por las mutaciones de resistencia primaria. La acumulación de mutaciones primarias y secundarias puede conducir a la reducción significativa en la susceptibilidad a los fármacos IPs.</p>	<p>Saquinavir (SQV)</p> <p>Ritonavir (RTV)</p> <p>Indinavir (IDV)</p> <p>Nelfinavir (NFV)</p> <p>Amprenavir (APV)</p> <p>Atazanavir (ATV)</p>	<p>L10I, G48V, I54V/L, A71V/T, V77I, V82A, I84V, L90M</p> <p>L10I, K20R, M36I, M46I, I54V, A71V/T, V77I, V82A/F/T/ S, I84V, L90M</p> <p>L10I, K20R, M36I, M46I, I54V, A71V/T, V77I, V82A/F/T/ S, I84V, L90M</p> <p>L10I, D30N, M36I, M46I, A71V/T, V77I, V82A/F/T/ S, L90M</p>

			L10I, V32I, M46I, I50V, I54V, I84V, L90M V32I, M46I, I50L, I54L, A71V/T, V77I, V82A/F/T/ S, I84V, N88S, L90M
Inhibidores de la integrasa	<p>Se cree que las mutaciones que confieren resistencia a los inhibidores de la integrasa desencadenan cambios conformacionales dentro de la bolsa catalítica que resulta en un aumento de la energía vinculante de los inhibidores de la integrasa. La resistencia al raltegravir se asoció sin ambigüedad con dos vías genéticas independientes que implican mutaciones primarias en N155(N155H) y Q148 (Q148K / R / H) llevados por el 68% de los sujetos. Posteriormente se describió una tercera vía asociada con el Y143R / C / H que ocurren con menos frecuencia.</p>	<p>Raltegravir (RAL)</p> <p>Elvitegravir (EVG)</p> <p>Dolutegravir (DTG)</p>	<p>T66AIK E92Q, E138KAT, G140SAC, Y143RCH, Q148HRK, N155H</p> <p>T66AIK E92Q, E138KAT, G140SAC, S147G, Q148HRK, N155H</p> <p>T66K E92Q, E138KAT, G140SAC, Q148HRK, N155H</p>

Adaptado de: (Ammaranond & Sanguansittianan, 2012; Mouscadet, Delelis, Marcelin, & Tchertanov, 2010; Stanford, 2017; Wainberg et al., 2012)

2.5. Evaluación del desempeño de un método para genotipificar VIH

El sistema comercial disponible para genotipificar HIV-1 está diseñado y aprobado para las cepas del subtipo B del grupo M del VIH-1 generando una desventaja para aquellas áreas geográficas en donde predominan otros subtipos y CRFs del VIH-1 (Acharya et al., 2014). El tipo de muestra mayor empleado para desarrollar este método es el plasma, el cual requiere condiciones estrictas en cuanto cadena de frío durante su recolección, almacenamiento y transporte, además de un buen entrenamiento en la recolección de sangre venosa (Inzaule et al., 2013). En los países de bajos recursos y que tienen zonas de difícil acceso han implementado el uso de gotas de sangre seca en el papel filtro whatman 903 ®, siendo este tipo de papel el Gold estándar en los estudios de genotipificación de VIH, ya que otros tipos de papel filtro tal como el M-TFN y A-226, no han demostrado tener la misma eficiencia para su uso previsto (E. Rottinghaus et al., 2013). La recolección de sangre seca en papel filtro no requiere volúmenes grandes de sangre, se puede recolectar por punción capilar y no requiere separación cuando se realiza por punción venosa (E. K. Rottinghaus et al., 2012), además de no necesita ultra congelación durante su transporte y almacenamiento disminuyendo el costo del envío (Youngpairoj et al., 2008; Zhou et al., 2011), sin embargo, algunas limitaciones tales como el límite de detección, la inestabilidad de los ácidos nucleicos a largo plazo, almacenamiento y la interferencia del ADN proviral dificultan su implementación (Rodríguez j., 2015). Por lo anterior, la OMS recomienda la sangre seca en papel filtro se use en individuos sin previa exposición a fármacos ARV, ya que se espera que estos tengan cargas virales más altas, que en pacientes que necesitan monitoreo post-tratamiento (S. Bertagnolio, Parkin, Jordan, Brooks, & Garcia-Lerma, 2010).

Las técnicas de genotipificación para VIH *in-house* son métodos de ensayo normalizados tipo II, es decir que ha sido publicado como un sistema de medida completo con una aplicación específica sufriendo algunas modificaciones. Todo método de diagnóstico adoptado por un laboratorio debe establecer sus características de desempeño y sus limitaciones, confirmando que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas para su uso previsto, a este proceso se le denomina “validación de un método de ensayo” (Eurolab España, 2016).

Las características de desempeño de un método analítico a evaluar con una validación son: Recuperación, Sensibilidad, Selectividad / Especificidad, Robustez, Límite de detección, Límite de cuantificación, Intervalo lineal y de trabajo, Reproducibilidad y Repetibilidad (Eurolab España, 2016; INECC-CCA, 2010), sin embargo su determinación depende de la naturaleza del

ensayo que se quiere evaluar, como por ejemplo si es de tipo cualitativo y cuantitativo (Eurolab España, 2016).

Para la evaluación de métodos cualitativos como lo es la genotipificación para VIH como estrategia mundial para la prevención y evaluación de farmacorresistencia, la OMS establece los requisitos mínimos que debe cumplir un laboratorio para la producción de datos de genotipos de manera exacto y reproducible para aquellos países interesados en realizar vigilancia en farmacorresistencia para el VIH (Parkin et al., 2012). Durante los ensayos de genotipificación se tiene diferentes pasos y a su vez puntos críticos que permiten evaluar el desempeño de la técnica, como lo son: La extracción del genoma viral, la amplificación del fragmento de interés y la obtención de una secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos específica con el menor número de errores sistemáticos permitiendo la máxima similitud entre las réplicas de una misma muestra y por consiguiente la concordancia entre los patrones de mutación identificados. La OMS sugiere la metodología de verificación de la precisión, sensibilidad analítica y linealidad de la técnica de genotipificación que se puede aplicar especificando el número de muestras y replicas mínimas de forma significativa (Inzaule et al., 2013; Parkin et al., 2012).

- **Precisión o veracidad:** es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí y se expresa a través de parámetros estadísticos que describen la expansión de los resultados, expresada como la desviación estándar (o desviación estándar relativa), calculada a partir de los resultados obtenidos mediante la realización de mediciones repetidas en materiales y condiciones adecuadas y específicas. Para los métodos cualitativos, la precisión no se puede expresar como una desviación estándar, pero puede expresarse como tasas de verdaderos falsos positivos y negativos. La evaluación de la precisión requiere la realización de mediciones repetidas en materiales adecuados. Los materiales deben ser representativos de las muestras de ensayo en términos de la matriz y la concentración de analito, la homogeneidad y la estabilidad. Las réplicas también deben ser independientes, es decir que durante todo el proceso de medición, incluyendo los pasos de preparación de muestras, debe repetirse. El número mínimo de repeticiones varía con según la complejidad y costo de la técnica (Eurolab España, 2016).

Para la técnica de genotipificación de VIH-1 la veracidad debe ser evaluada comparando la similitud de secuencias (Nucleótidos, aminoácidos y mutaciones de farmacorresistencia incluyendo los cambios de aminoácidos mixtos), por medio de réplicas de la misma muestra en la misma corrida. Se recomienda como mínimo realizar 5 réplicas de 3 muestras que tengan diferentes subtipos de los VIH-1 y diferentes patrones de mutaciones de resistencia. Las secuencias de las réplicas de la misma muestra deben ser comparadas y sus

discrepancias cuantificadas.(S. Bertagnolio et al., 2010; Parkin et al., 2012; WHO, 2012)

- La **Reproducibilidad o precisión intermedia** es una medida que supone dar la mayor variación en los resultados, ofreciendo una estimación de la variación cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables que las condiciones de repetibilidad. Las condiciones exactas utilizadas deben establecerse en cada caso. El objetivo es obtener una estimación de la precisión que refleje todas las fuentes de variación que se producirán en un solo laboratorio en condiciones de rutina (diferentes analistas, períodos de tiempo prolongado, diferentes piezas de equipos etc.) (Eurolab España, 2016).

La reproducibilidad para la técnica de genotipificación de VIH-1 se evalúa a través de la similitud de secuencia (Nucleótidos, aminoácidos y mutaciones de farmacoresistencia) incluyendo diferentes fuentes de variabilidad tales como el operador, cambio de lote de reactivos, piezas clave de equipos y tiempo dos semanas o más. Se recomienda como mínimo realizar 5 réplicas de 3 muestras que tengan diferentes subtipos de los VIH-1 y diferentes patrones de mutaciones de resistencia. Además se recomienda analizar de 10 a 20 muestras por duplicado. Las secuencias de las réplicas de la misma muestra deben ser comparadas y sus discrepancias cuantificadas (S. Bertagnolio et al., 2010; Parkin et al., 2012; WHO, 2012).

- **Límite de detección y sensibilidad analítica:** límite de detección es la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza específico. La sensibilidad analítica es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida (por ejemplo, una concentración de analito), es decir, el gradiente de la curva de respuesta. Para los métodos que cubren dentro de su alcance matrices muy diversas, puede ser necesario determinar el límite de detección y sensibilidad analítica para cada matriz por separado (Eurolab España, 2016).
La sensibilidad analítica es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida (por ejemplo, una concentración de analito), es decir, el gradiente de la curva de respuesta. Se recomienda utilizar el adjetivo 'analítica' para evitar confusión con el término 'sensibilidad de diagnóstico' utilizado en laboratorios de diagnóstico clínico. Se utiliza también el término 'sensibilidad' para referirse al límite de detección, pero se no se aconseja este uso en el VIM (Vocabulario Internacional de metrología – conceptos básicos y generales y términos relacionados) (Eurolab España, 2016).

La genotipificación en VIH evalúa el límite de detección: mínimo de copias de ARN requerido (usualmente referido como número de copias de RNA por ml) en plasma o sangre seca la amplificación del genoma viral en la reacción de cadena polimerasa (PCR) y la sensibilidad analítica como la reproducibilidad de dicho límite de detección, incluyendo controles negativos intercalados con muestras positivas. Se puede realizar con dos enfoques de diseño (S. Bertagnolio et al., 2010; Parkin et al., 2012; WHO, 2012):

- I. Dilución seriada de una muestra con carga viral alta con un diluyente apropiado (Para la gota de sangre seca, se usa sangre total de un donante negativo). Para lograr un rango de número de copias virales se realiza la corrida de réplicas de cada una de las diluciones. La sensibilidad de la amplificación está definida como el número de copias con el cual una mayoría de las amplificaciones son exitosas (Chew et al., 2012; WHO, 2012)
 - II. Correr un gran número de muestras (>50) que tengan diferente número de copias definiendo rangos para el límite de detección. La sensibilidad de la amplificación está definida como el porcentaje de muestras que pueden ser amplificadas dentro de un rango definido, (ejemplo: 95% de la muestras son amplificadas dentro de un rango de 1000 a 4000 copias/ml) (S. Bertagnolio, Parkin, NT., Jordan, M., Brooks, J., García-Lerma, JG., 2010; Parkin et al., 2012; WHO, 2012).
- **Linealidad:** es la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado (Eurolab España, 2016).

Para el caso de la genotipificación de VIH-1 la linealidad se realiza evaluando la capacidad del método para obtener una secuencia de nucleótidos a partir de muestras diferente número de copias dentro un rango establecido incluyendo el límite de detección (S. Bertagnolio et al., 2010; Parkin et al., 2012; WHO, 2012)

3 PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿La técnica *in-house* para identificar el perfil genético del VIH-1 asociados a la farmacorresistencia aplicada, cumple con criterios de calidad establecidas por la OMS?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el desempeño de una técnica in-house para identificar el perfil genético del VIH-1 asociado a farmacorresistencia

Objetivos específicos

- a) Estandarizar técnica *in-house* que permita tipificar e identificar el perfil genético del VIH-1 asociados a la farmacorresistencia en plasma y gotas de sangre seca (GSS).
- b) Determinar el desempeño de la técnica in-house estandarizada frente a los requisitos de calidad establecidos por la OMS para la detección de mutaciones asociadas a resistencia del VIH-1.
- c) Evaluar la concordancia de las mutaciones de fármaco resistencia obtenidos por la técnica *in-house* vs resultados previos de las muestras analizadas en el Centro para la Excelencia en VIH / SIDA (CFE) en Vancouver-Canadá.
- d) Evaluar la concordancia de las mutaciones de fármaco resistencia obtenida por la técnica in-house vs resultados de muestras analizadas con la técnica comercial ViroSeq.

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudio:

Descriptivo trasversal.

5.2 Tipo de muestra:

El tamaño y selección de la muestra se realizó a conveniencia.

5.2.1 Material Quality control (MQC)

- I. **Plasma MQC positivo:** se empleó (n=32) plasmas positivos para VIH-1 de pacientes de diferentes regiones de Colombia sin previa exposición a los ARV caracterizadas en la secuencia de nucleótidos que codifica para la RT y PR viral y patrones de resistencia a los antirretrovirales por el Centro para la Excelencia en VIH / SIDA (**CFE**)

en Vancouver-Canadá. Estos plasmas hacen parte de la seroteca del grupo de virología del Instituto Nacional de Salud y fueron seleccionados teniendo en cuenta los siguientes criterios: diferentes subtipos (subtipos B y No B) de VIH-1 (figura 10a y 10b), presencia de mutaciones con respecto a la secuencia VIH-1 salvaje que pueden o no conferir resistencia a los ARV y la carga viral (tabla 8). Este material se identificó como **MQC-CFE-** seguido por el número de identificación del plasma.

- II. **Plasma MQC Negativo:** plasma negativo para detección de p24 y anticuerpos contra VIH-1 y 2.

- III. **Sangre seca en papel filtro (GSS)** el material de sangre seca en papel filtro se identificó con las iniciales **GSS-MQC** seguido por el número correspondiente al plasma utilizado para fortificarlo.
 - **Sangre seca en papel filtro MQC positivo:** se fortificó en partes iguales sangre total anticoagulada con EDTA negativa para VIH 1 y 2 con 12 de los treinta y dos plasmas **MQC** previamente descritos (ver tabla 9) (S. Bertagnolio et al., 2010), Luego, se dispensó 50 µL por campo en tarjetas de papel filtro whatman 903 con cuatro campos por tarjeta y secando por 4 horas (ver figura 11). Se realizó a 4°C y temperatura ambiente verificando la temperatura optima de conservación al primero, tercero y décimo quinto día. Cada uno de los remanentes de la dilución (plasma positivo y sangre total negativa) fueron incubados a 4°C y temperatura ambiente por 24 horas antes de dispensarse en el papel filtro y una vez dispensadas se incubaron a la misma temperatura por tres días, esto con el fin de determinar si la detección del ARN se afecta cuando la muestra no puede dispensarse de inmediato en el papel filtro.
 - **Sangre seca en papel filtro (GSS) MQC Negativo:** g gotas de sangre seca total anticoagula con EDTA en papel filtro, negativa para detección de p24 y anticuerpos contra VIH-1 y 2.

5.2.2 Muestras de Plasma positivo para VIH-1:

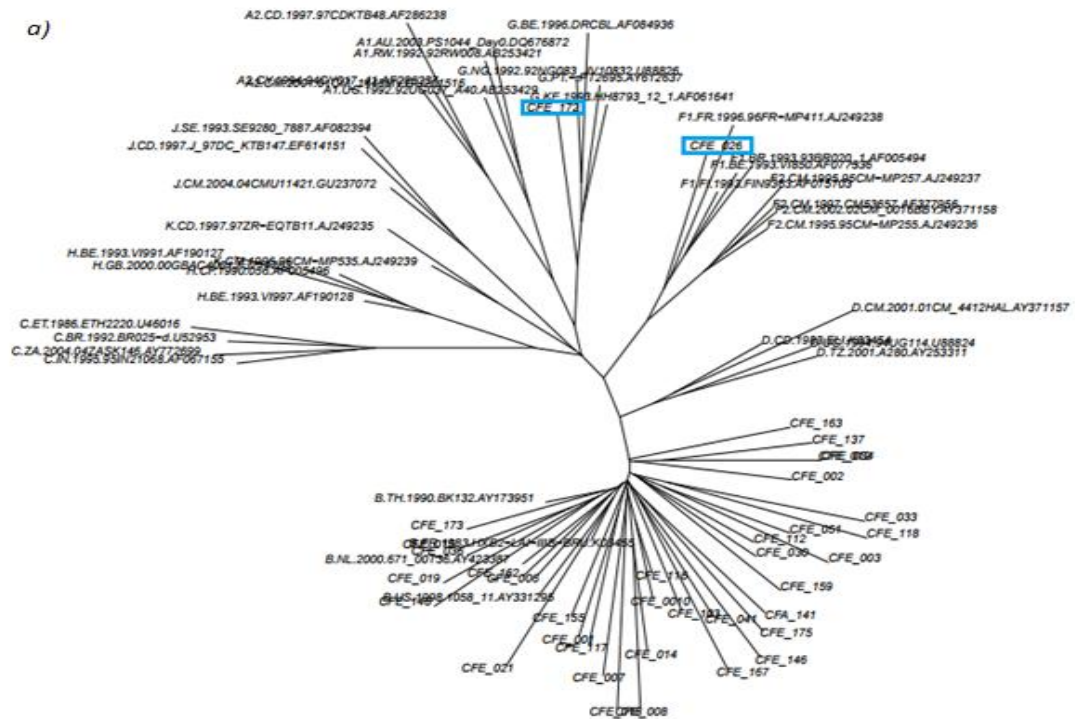
Se empleó (n=11) plasmas de pacientes con previa exposición a TAR caracterizada en la secuencia de nucleótidos que codifica para la RT y PR

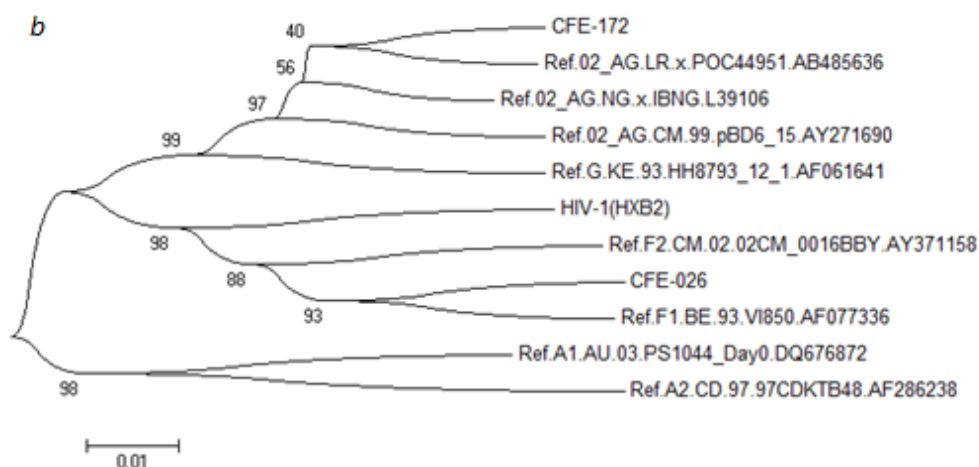
viral por la técnica comercial ViroSeq por el laboratorio de molecular de la clínica Colombia.

5.2.3 Plasma anticoagulado con EDTA negativo

Plasma negativo para VIH- 1 y 2 por pruebas de Inmunoensayos.

Figura 10. Árbol filogenético construido con 32 secuencias de la región que codifica para la RT y PR viral emitidas por el Centro para la Excelencia en VIH / SIDA (CFE) en Vancouver-Canadá comparadas con los subtipos de referencia del grupo M de la base de datos ALAMOS HIV. **a) En todas las muestras seleccionadas se identificaron Subtipos B y No B de VIH-1. b) Dentro de los subtipos NO B se identificó una cepa recombinante CRF 02_AG y subtipo F.**





Fuente: elaboración propia

Tabla 9. Material quality control (MQC).

Código	Subtipo	Mutaciones gen que codifica para la Proteasa	Mutaciones gen que codifica para la Transcriptasa	Resistencia a ARV	Carga viral
MQC-CFE-001	B	A71AV,E35D, N37D, L63P, I72E, V77I, I93L	K20R, V35IV, V60I, D86N, A98S, V118I, K122P, D177E, I195IL, G196E, T200IT, E203DE, R211KR, F214L, V245AEKT, K249KR, I293V, P294T, E297EK, I329V, G333EG, Q334FLPS, A360T, K390R, T397AT	Rilpivirine (RPV): Resistencia	72.800
MQC-CFE-002	B	I13V, E35D, R41K, D60E, L63P, I64V	K49R, I50V, V60I, V118I, K122E, D123N, P133S, T165V, D177E, R211K, F214L, K275KQ, K277KR, P294T, E297K, I329L, M357T, T369A	susceptible para todos	2139
MQC-CFE-003	B	A71V, I13IM, E35D, I62V, L63P, I93L	T215AT, V35N, T39A, V60I, T69AT, V118I, D121H, K122E, I135T, I142T, T165I, E169D, D177E, R211Q, F214L, A272P, A288S, I293V, Q334N, M357MT, A376S, T377Q, K390R, A400S	Abacavir: Reducida respuesta	94070
MQC-CFE-006	B	A71V, K14R, N37S, L63P, I72E, V77I, I93IL	V21I, V35M, T39E, E40EK, V60I, D86E, I135T, I142V, R211K, A272P, T286A, E297A, V314I, D324E, F346H, M357T, A376T	susceptible para todos	24476
MQCCFE-007	B	Q58E, I13V, L19V, E35D, N37S, R57K, D60E, I62V, L63P, I66IV	A62V, V35L, I50V, T69A, K122EK, D123E, L205LV, D250E, K277KR, I293V, P294T, E297K, I329L, E344D, R356K, M357L, A360V, K366R, T369AT, Q373HQ, I375IV, T377M	susceptible para todos	24041
MQC-CFE-008	B	I15V, G16E, E35D, R57K, Y59F, D60E, Q61D, L63T, I72T	D123E, I135T, D177E, V179I	susceptible para todos	107460
MQC-CFE-010	B	I13V, R41H, L63P	V60I, I135V, L210F, A272P, K277KR, T286AT, I293V, E297A, Y319H, F346G, R356K, M357T, I375V, K390R	susceptible para todos	157541

MQC-CFE-014	B	I15V, Y59F, D60E, Q61E, L63P	S48T, K103KR, S162C, I178IL, R211K, A272P, K277R, K281R, I293IV, E297A, I326V, E344D, A360AITV, T377IT K103R	susceptible para todos	10015
MQC-CFE-015	B	Q58E, A71V, G16E, N37S, P39K, K43KR, D60DE, I62V, L63A, I72E, V77I, I93L	A98S, K122E, I135T, G196E, Q207N, R211K, V245D, A272P, Q278H, I293V, P294A, E297EG, I329L, A376S, K390R, A400S	susceptible para todos	307803
MQC-CFE-018	B	I13V, E35D, N37Q, R41K, L63P, I93L	K20R, V60I, D123N, I135M, S162D, Q197P, R211K	susceptible para todos	33826
MQC-CFE-019	B	A71V, K20R, M36I, N37Q, P39L, R41KR, L63P, I72V, V77I, I93L	V75AV, K20R, K49R, I50V, V60I, D123E, I135T, S162N, R172KR, D177DN, I178M, G196E, E248D, K277R, T286A, E297R, A304E, S322T, I329L, R356K, M357T, T377M, K390R, P392LP	Reducida respuesta a stavudine	10597
MQC-CFE-021	B	T12N, I13IV, G16E, N37ST, P39S, L63ST, I64IV, I72V, V77I	T215L, K32T, V35R, V118I, I135T, S162C, T200A, R211K, F214L, Y271FY, A272P, V276I, K281KR, E291D, V292IV, E297AE, K311KR, Q334L, M357IM, R358K, K390R, K395KR, E399D	Bajo nivel de resistencia a zidovudine (AZT); stavudine (D4T)	759817
MQC-CFE-026	F	K20M, K14Q, I15V, G16E, E35D, M36I, R41K, R57K, Q61N, L63A, E65Q, L89I, I93L	D86E, D123E, I135V, S162C, E169D, K173A, Q174K, Q207E, R211K	susceptible para todos	278832
MQC-CFE-030	B	L10I, V11IV, I13V, I15V, G16E, L19I, M36I, P39T, I62V, L63Q, V82IV, L89M	V35I, S48T, V60I, K122E, I135T, D177E, Q207H, R211K	susceptible para todos	55740
MQC-CFE-033	B	N37S, R41KR, L63S, I64V, E65DE, I72V, V77I, I93L	E138A, V179D, I142V, S162C, P176Q, T200A, I202V, Q207H, R211K, F214L, A272P, T286A, I293V, E297A, G333EG, Q334EGKR, F346C, G359N, Q394L, E399D	susceptible para todos	10490
MQC-CFE-036	B	G16E, N37S, P39K, D60E, I62V, L63P, I64V, I72V, V77I	K101KR, I142IT, I178M, G196E, R211K, V245Q, V276I, I293V, P294T, K311R, Q334E, A376S, K390R, A400S	susceptible para todos	11592
MQC-CFE-097	B	L63T, I72V, V77I, P79PQ	K20KR, D123E, I135T, S162HY, D177E, V179I, R211K, A272S, A288S, I293V, K311KR, G333E, Q334H, G359S, T369A, A371V, S379G, K390R, E396DE	susceptible para todos	7863
MQC-CFE-103	B	T12P, K14R, I15V, G16EG, R41K, D60E, L63A, V77I, I93L	K103N, K20KR, K32N, V35I, A98S, K102Q, K122E, I135K, S162C, R211K, A272P, T286A, I293V, P294S, E297K, A304E, P345Q, F346Y, K347R, T377V	Resistencia a Efavirenz (EFV) y nevirapine (NVP)	455341
MQC-CFE-112	B	L10IL, A71AT, I13V, K14R, I15V, L19Q, E35D, N37DN, Q61HQ, L63P, I64V, H69Q, I72IV	T69N, T215ST, V35M, T39AT, V60I, S68G, V118I, K122E, I135T, T139A, I202V, R211K, F214L, A272AP, T286A, I293V, V317A, I329V, Q334E, M357R, R358K, K366R, A371V, T377L, K390R	susceptible para todos	394490
MQC-CFE-116	B	L10I, N37D, R41H, I62IV, L63P, C67S, I93L	K32KR, A98S, K122E, E169D, I178IM, G196E, T200AT, Q207E	susceptible para todos	45756

MQC-CFE-117	B	L19E, N37A, L63AP, E65DE, I72R	K103N, V35L, V60I, A98S, I142LR, R211K, S251N, A272P, T286A, V292I, K311KR, I329L, P345Q, F346Y, M357T, R358K, K366R, A376S, T386IT, K390R	Resistencia: efavirenz (EFV), nevirapine (NVP)	50221
MQC-CFE-118	B	E35D, M36I, R41K, L63C, I72V, V82I	K32Q, V35M, T39AT, E40D, D121H, K122E, I135R, S162CW, D177E, I202IV, Q207E, R211K, F214L, A272P, K277KR, T286P, A288S, I293V, E297R, I326V, F346Y, K366R	susceptible para todos	96954
MQC-CFE-123	B	Q58EQ	I13V, I15V, L19Q, R41KR, L63A	susceptible para todos	48579
MQC-CFE-141	B	K14*K, I15V, R41N, D60E, L63A, K70R, I72V	V90I, V179E, D86E, K102Q, K104T, K166R, Q197K, T200A, I202V, R211KR, V245E, E248DE, D250DE, A272P, K277R, L283I, I293V, E297R, P345KPQT, R356K, S379GS, K385R, T386I, K390R	susceptible para todos	1493047
MQC-CFE-146	B	G17DE, Q18EQ, N37S, R41K, I62V, L63P, V77I, I93L	I178M, T200S, I202IV, Q207E, H208HY, V245E, A272P, I293V, P294T, I329L, G333D, R356K, A360T, V365I, A376S, K390KR, A400S	susceptible para todos	13450
MQC-CFE-148	B	K14R, L19Q, L33V, N37C, R41K, I62V, L63Q, I64V, E65D, V82I, I93L	D123E, I135T, Q174K, D177E, I195L, G196E, R211K, V245A, A272P, I293V, K311R, D320E, S322T, D324E, R356K, M357T, A400S	susceptible para todos	82663
MQC-CFE-155	B	T12S, N37A, I62V, L63P, V77I, I93L	T69N, S68G, K102KR, K122EK, D123DN, I135IT, S162C, Q207E, V245E, A272P, T286AT, E297EK, E312T, D324P, Q334LQ, M357T, R358K, G359S, S379G, V381I, K390R	susceptible para todos	300000
MQC-CFE-159	B	L10I, K20M, I13V, K14R, I15V, G16E, M36I, L38LV, P39LPS, R41K, R57KR, I62V, L63H, I64V, I72V, I93L	V35M, V118IV, D121HY, K122D, D123E, I142V, S162A, K166KR, D177E, T200A, R211Q, F214L, V245M, A272P, K277R, V292I, I293V, P321PS, S322T, Q334L, M357T, A376AS, T377	susceptible para todos	14703
MQC-CFE-163	B	T12N, L19I, M36I, P39S, R41K, R57KR, D60DE, I62IV, L63PS	T215DE, K20R, V35T, S48T, V60I, I135V, S162A, D177E, L210FL	Bajo nivel de resistencia a zidovudine (AZT), Stavudine (D4T)	6998
MQC-CFE-167	B	T12A, R41K, L63P, I64L, V77I, I93L	T215AT, V179E, K11KR, D123DE, I142V, S162C, D177N, T200E, V245E, A272P, V292I, I293V, I329L, G333E, Q334H, T377LV, K390KR	susceptible para todos	420555
MQC-CFE-172	CRF02_AG	K20I, I13V, K14KR, G16EG, E35D, M36I, R41K, H69K, K70R, V77IV, L89M	P9A, V35K, T39A, S48T, V60I, K122E, I135V, S162A, K173A, Q174DN, D177E, T200A, Q207K, R211K, V245K, D250E, S251N, A272G, T286A, V292I, I293V, P294T, S322T, I326V, G335D, R356K, M357K, G359S, A371L, I375V, A376S, T377M, K390R	susceptible para todos	262792
MQC-CFE-175	B	I13V, G16E, K20R, M36I, P39S, I62V, L63S, I64V, E65D	E138A, K238T, K20R, D86E, D123E, I135V, S162C, K173Q, I202V, A272P, K275KR, K277KR, Q278HQ, T286A, I293V, P294T, E297K, G335D, M357T, S379G, T386I, A400S	susceptible para todos	14180

Tabla 10. Material quality control GSS

Código	Subtipo	Carga viral	Código GSS	Carga viral
		Plasma-MQC		Dilución 1:2 Sangre total negativo
MQC-CFE-001	B	72.800	GSS-MQC-001	36.400
MQC-CFE-002	B	2139	GSS-MQC-002	1.070
MQC-CFE-003	B	94070	GSS-MQC-003	47.035
MQC-CFE-006	B	24476	GSS-MQC-006	12.238
MQC-CFE-007	B	24041	GSS-MQC-007	12.021
MQC-CFE-008	B	107460	GSS-MQC-008	53.730
MQC-CFE-018	B	10015	GSS-MQC-014	5.008
MQC-CFE-0112	B	394490	GSS-MQC-112	197.245
MQC-CFE-0141	B	1493047	GSS-MQC-141	746.524
MQC-CFE-0148	B	82663	GSS-MQC-148	41.332
MQC-CFE-0155	B	300000	GSS-MQC-155	150.000
MQC-CFE-0159	B	14703	GSS-MQC-159	7.352

Nota: El valor de la carga viral en sangre seca es teórico teniendo en cuenta la dilución inicial de sangre total y plasma positivo para VIH-1 y la carga de hematocrito propia de esta matriz (Parkin et al., 2012).

5.3 Estandarización de la técnica de genotipificación in house

5.3.1 Extracción de ácidos nucleicos

5.3.1.1 Extracción de ARN viral en plasma MQC-CFE

Se realizó el proceso de extracción a partir de un volumen de 140 µl de plasma, empleando el kit QIAamp viral RNA minikit (Qiagen), siguiendo las

instrucciones del fabricante con un volumen de elución final de 60 μ l (Monleau et al., 2009).

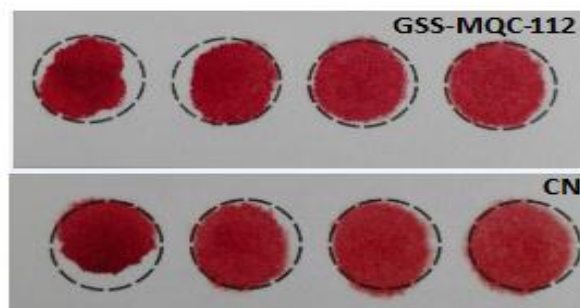
5.3.1.2 Extracción de ARN viral en plasma proveniente de pacientes con previa exposición a los ARV.

Antes del proceso de extracción se procedió a un proceso de concentración de las muestras por ultracentrifugación. Las muestras fueron sometidas a dos ciclos de centrifugación: una alícuota inicial de 1ml de plasma a 13000 rpm por 1 hora, se descarta el sobrenadante y se agrega 1 ml de plasma al pellet y se repite la centrifugación (Parra, 2009). El proceso de extracción se realizó a partir de un volumen de 140 μ l de plasma, empleando el kit QIAamp viral RNA minikit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante con un volumen de elución final de 60 μ l (Monleau et al., 2009).

5.3.1.3. Extracción del ARN viral de sangre seca en papel filtro.

Se usó el **GSS-MQC-112** y se determinó el número de perforaciones, tipo de eluyente (buffer de lisis AVL o solución salina) y tiempo de elución, aplicando el siguiente esquema:

Figura 11. Sangre seca en papel filtro



Fuente: Laboratorio de virología. Instituto Nacional de Salud.

Tabla 11. Estandarización de la extracción de RNA viral de GSS.

No. Perforaciones (botones) de la GSS en papel filtro	Tiempo de incubación			
	Muestra GSS-MQC-112 eluida con buffer de lisis AVL		Muestra GSS-MQC-112 eluida en solución salina	
	2h	3h	2h	3h
2	2h	3h	2h	3h
3	2h	3h	2h	3h
4	-	3h	2h	3h

El proceso de extracción se realizó a partir de un volumen de 140 μ l de eluido empleando el kit QIAamp viral RNA minikit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante con un volumen final de 60 μ L.

5.3.2 Amplificación región que codifica para la proteasa (PR) y transcriptasa inversa (TI) del gen pol del VIH-1

Luego del proceso de extracción de ARN, se realiza la amplificación de la región que codifica para la proteasa y transcriptasa del gen *pol* del VIH-1, a través de una PCR anidada con dos rondas de amplificación. La primera ronda se realiza a través de una RT-PCR (reacción en cadena de polimerasa-transcripción inversa), utilizando una enzima One Step III súper-script (Invitrogen) que actúa como transcriptasa inversa y como ADN polimerasa simultáneamente. Los cebadores utilizados son: K1Forward 5`-3` y RT20 Reverse 5`-CTGCCAGTTCTAGCTCTGCTTC-3` (LVM-UFRJ, 2014; Maueia et al., 2011), los cuales amplifican el segmento que corresponde a los nucleótidos (nt) que se encuentran desde la posición 2147 al 3462 del genoma de HXB2 (virus salvaje VIH-1). La reacción de PCR se obtuvo mezclando: 12.5 μ l de Buffer TP2x, 0.25 de cada cebador (25pMoles), 1 μ l de enzima One Step III super-script y 11 μ l del producto de la extracción. El perfil térmico se para la RT-PCR fue: 30 minutos a 55°C para la retrotranscripción, seguido de 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos; 40 ciclos de: a) desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, b) la hibridación se realizó con una rampa de 55, 57 y 59°C, confirmando la temperatura óptima de anillamiento de los primers a 57°C durante 30 segundos, c) extensión a 68°C durante 80 segundos, y por último, un ciclo de extensión final a 68°C durante 5 minutos.

En seguida se realiza una PCR anidada al producto de PCR obtenido anteriormente que comprende la proteasa 297 nt (PR) y la transcriptasa

inversa 660 nt (TI), usando una enzima *Taq* polimerasa (Invitrogen). Las secuencias de los cebadores utilizados fueron: DP10 Forward 5'-CAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG-3' y RT12 Reverse 5'-CAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA-3' (LVM-UFRJ, 2014; Maueia et al., 2011). La reacción de PCR se obtuvo mezclando: 5 µl Buffer 10X, 1 µl dNTPs (10 mM), 2 µl MgCl₂ (50mM), 0.5 µl de cada uno de los cebadores (25pmles/ µl), 0.3 µl *Taq* polimerasa, 3 µl del producto de la primera PCR y completar 50 µl con agua libre de RNasa. El perfil térmico empleado fue: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos; 5 ciclos de: a) desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, b) hibridación a 56°C durante 1 minuto, c) extensión a 72°C durante 1 minuto; 25 ciclos de: a) desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, b) hibridación a 58°C durante 45 segundos, c) extensión a 72°C durante 90 segundos y por último, un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos (LVM-UFRJ, 2014).

Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en tampón TAE 1x, y teñidos con 2.0 µL de SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen). El tamaño del producto esperado es de aproximadamente a 1000 bp.

5.3.3 Purificación de productos de PCR

El producto de la PCR fue purificado utilizando el kit ExoSAP (affymetrix) mezclando 5 ul del producto de PCR con 2 ul de reactivo ExoSAP-IT, se incubo a 37°C por 15 minutos (degrada primers y nucleótidos) y luego a 80 °C por 15 minutos (Laiton, 2015).

5.3.4 Reacción de secuencia

La reacción de secuencia se compone de: 2 µl de BigDye, 2 ul Buffer 1x, 4.0 de cebador (0.8 µM), 2 µl del producto de PCR purificado a una concentración aproximada de 25 ng/ul. Los cebadores utilizados para la secuenciación son:

DP10	Forward		
5'CAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG-3'	DP11	Reverse	5'-
CATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA-3'	RT12	Reverse	5'-
CAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA-3'			

(Prellwitz, 2014).

El perfil térmico de la secuenciación fue: un ciclo de desnaturalización a 96°C durante 1 minuto; 25 ciclos de: a) desnaturalización a 96°C durante 10 segundos, b) hibridación a 50° C durante 5 segundos, y c) extensión a 60°C durante 4 minutos (Laiton, 2015).

5.3.5 Purificación de la reacción de secuencia

La reacción de secuencia fue purificada con el estuche BigDye® X Terminator Purification Kit, cada reacción de purificación se compone de: 45 µL de X Terminator, 10 µL de solución SAM a cada muestra. Luego de agitar en Vortex durante 30 minutos y Centrifugar a 1000g durante 2 minutos, se transfiriendo el sobrenadante a la placa del analizador. Los productos de la reacción fueron analizados mediante electroforesis en un secuenciador capilar automático ABI 3130 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU (Laiton, 2015).

Los fragmentos de secuencias obtenidas fueron ensamblados con el programa Lasergene segMan pro.

5.3.6 Análisis de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos fueron ensambladas con el programa SeqMan pro y alineadas con el programa bioEdit Sequence Alignment Editor Versión 6.0. La similitud entre las secuencias de nucleótidos fue comparada con el método de neighbor-joining modelo de No. de differences en el programa MEGA6 con un Bootstrap de 950 repeticiones.

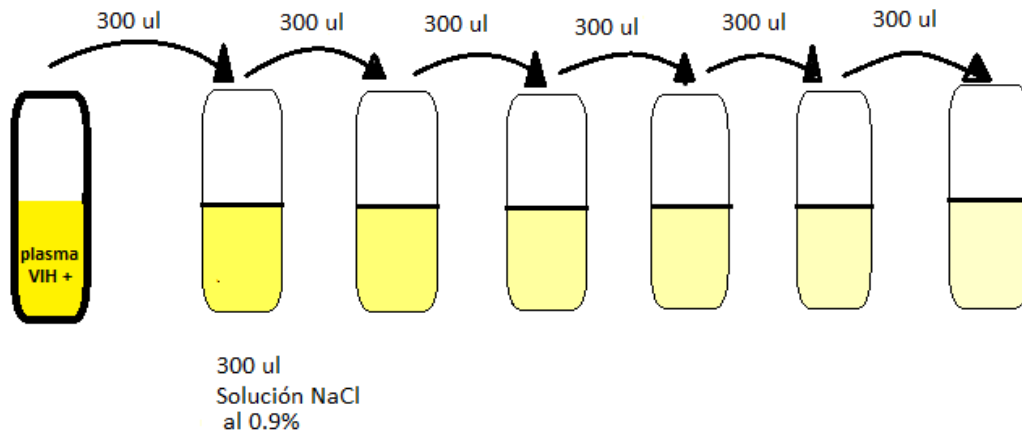
La presencia de mutaciones de resistencia a medicamentos antiretrovirales fue analizada con el “HIV DB Program” de la base de datos de la Universidad de Stanford (Stanford, 2017).

5.4 Evaluación del desempeño de la técnica in-house

5.4.1 Análisis del límite de detección y sensibilidad analítica de la PCR en plasma y GSS.

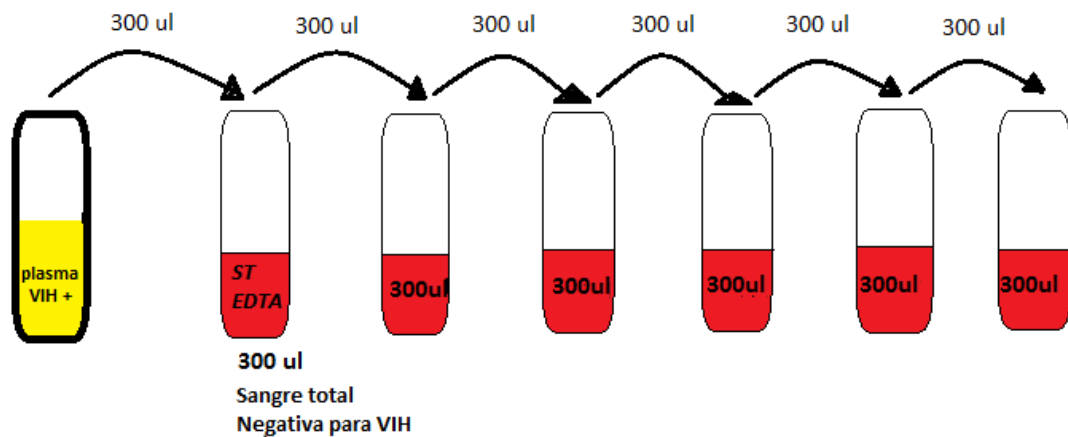
Para el análisis en plasma se realiza la dilución seriada del **MQC-CFE-021** con carga viral de 759.817 copias/ml en NaCl isotónica estéril como se ilustra en la figura 12.

Figura 12. Proceso de dilución de muestras de plasma positivo para VIH en solución de NaCl al 0.9%.



Para el análisis en sangre seca en papel filtro se realizó diluciones seriadas del **MQC-CFE-021** con carga viral de 759.817 copias/ml, en sangre total anticoagulada con EDTA negativa para VIH-1 y 2 (WHO, 2012) como se ilustra en la figura 13. De cada una de las diluciones preparadas se dispensó 50 µl por campo en el papel filtro whatman 903, secando por 4 horas a temperatura ambiente y almacenando a 4 °C y a temperatura ambiente.

Figura 13. Proceso de dilución de muestras de plasma positivo para VIH en sangre total negativa para VIH anti coagulada con EDTA (WHO, 2012).



Para hallar el límite de detección y sensibilidad analítica de la PCR tanto en plasma como en GSS se amplificó las diluciones seriadas, desde 1:2 hasta 1:2048 por triplicado, tanto para el plasma como para la GSS.

Análisis de los resultados

Se determinó el límite de detección o sensibilidad analítica para cada una de las matrices identificando la dilución en donde se obtuvo un amplicón en las tres replicas analizadas de un tamaño similar al control positivo.

5.4.2 Precisión (Repetibilidad y precisión intermedia o reproducibilidad)

La precisión del método se determinó con el porcentaje de similitud entre las secuencias entre nucleótidos y aminoácidos de las réplicas intracorrida de 15 MQC seleccionadas (ver tabla 8) (S. Bertagnolio et al., 2010).

Para determinar la precisión intermedia se aplicó una prueba de t para dos muestras, planteando las siguientes hipótesis:

H₀: Las secuencias de nucleótidos intercorrida son iguales.

H₁: Las secuencias de nucleótidos intercorrida son diferentes.

5.4.3 Linealidad

Se determinó con la amplificación del genoma viral en muestras de plasma con diferentes cargas virales incluyendo el límite de detección o sensibilidad analítica de la PCR.

5.5 Análisis de concordancia entre las técnicas para detectar mutaciones asociadas a farmacorresistencia.

Se realizó la comparación de las mutaciones de fármaco resistencia obtenidos por la técnica *in-house* vs resultados previos de las muestras analizadas en el Centro para la Excelencia en VIH / SIDA (CFE) en

Vancouver-Canadá y las obtenidas con la técnica *in-house* vs ViroSeq en la clínica Colombia.

Para el análisis estadístico se utilizó una tabla de contingencia para determinar sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo. Para determinar la concordancia entre las técnicas para detectar mutaciones de farmacorresistencia (DRMs) se obtuvo el índice kappa interpretado de la siguiente manera:

Nivel de concordancia	Índice Kappa
Baja	0.2 a 0.4
Moderada	0.4 a 0.6
Bueno	0.6 a 0.8
Alto	0.8 a 1.0

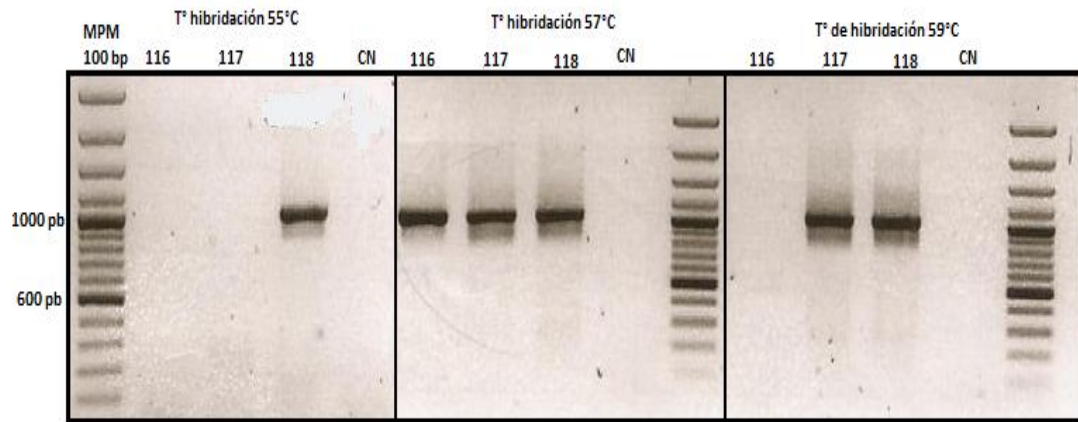
6 RESULTADOS

6.1 Objetivo específico 1

6.1.1 Estandarización de la PCR en plasma

Se confirmó que la temperatura óptima de anillamiento de los cebadores es 57°C.

Figura 14. Determinación temperatura optima de anillamiento. Muestras CFE-116, CFE-117, CFE-118, CN: plasma negativo para VIH por ELISA de cuarta generación.

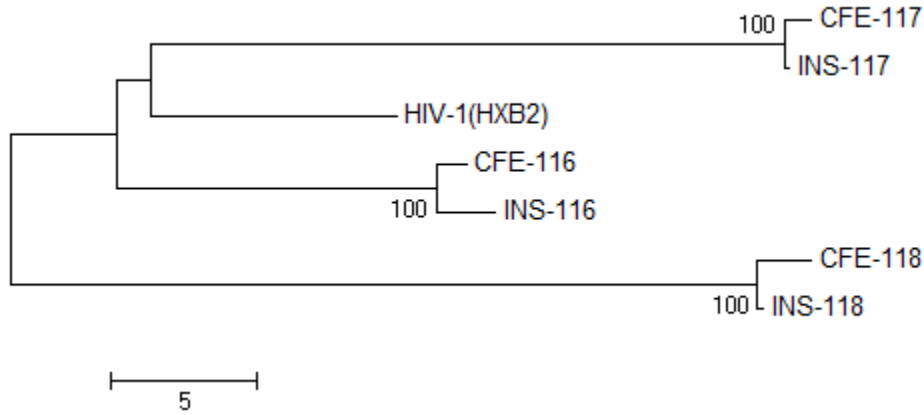


Fuente: Laboratorio de virología. Instituto Nacional de Salud.

Con la técnica *in-house* INS se obtuvo por electroforesis un fragmento de un tamaño aproximado de aproximadamente 1000 pb y una secuencia de 937 nucleótidos para las muestras MQC-117 y MQC-118, cuyo tamaño de secuencia es más corto que el tamaño promedio reportado con la técnica *in-house* CFE de 1503 nucleótidos aproximadamente. Para la muestra MQC-116 (CFE-116), el CFE reporta una secuencia de tamaño inferior a 1503 pb de 1 016 pb (fragmento desde la posición 2 253 al 3 269), en el INS se obtuvo una secuencia aún más corta con 732 pb (fragmento desde la posición 2528 al 3260), en donde no se obtuvo la secuencia de la región PR.

Alineando las secuencias y comparando las secuencias reportadas en el INS y el CFE se determinó 100% de similitud de la secuencia de nucleótidos como se puede observar en la figura 15.

Figura 15. Similitud entre las secuencias obtenidas en el INS Vs la técnica in-house del CFE. Dendrograma obtenido con el método Neihborg Joining, modelo Kimura-2- parámetros (0.5).



Fuente: elaboración propia

Del análisis de las secuencias obtenidas con el HIVdb program, se obtuvo de 1 a 99 codones de PR y 213 codones de la RT obtenidos por la técnica in house INS y comparables a la mismos fragmentos reportados por el CFE (no se tuvo en cuenta la región no secuenciada de las muestras), se obtuvo 26 mutaciones de aminoácidos reportadas por el CFE solo una no es concordante (I202IV) como se observa en la tabla 11, por lo tanto se deduce que el porcentaje de concordancia es del 96.1%

Tabla 12. Reporte de mutaciones obtenidas analizando las secuencias del INS y CFE en el HIVdb program

Cód. Muestra	Mutaciones gen Proteasa										Mutaciones gen Transcriptasa								Resistencia ARV															
	L10I	N37D	R41H	I62IV	L63P	C67S	I93L	K32KR	A98S	K122E	E169D	I178IM	G196E	T200AT	Q207E	L19E	N37A	L63AP		E65DE	I72R	K103N	V35L	V60I	A98S	I142LR	R211K	S251N	A272P	T286A	V292I	K311KR		
MQC-CFE-116	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																		S	
MQC-INS-116	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+																			S
MQC-CFE-117	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R: EFV y NVP	
MQC-INS-117	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R: EFV y NVP	
MQC-CFE-118	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	
MQC-INS-118	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	

6.1.2 Estandarización de la PCR en papel filtro

Se obtuvo producto de PCR para las GSS-MQC-112 en todas las condiciones sometidas como lo fueron eluyente, número de perforaciones y tiempo de incubación como se observa en la tabla 12, por lo que se definió que para los 11 GSS-MQC restantes se utilizarán dos (2) perforaciones eluidas en solución salina con dos horas de incubación.

Tabla 13. Resultado de la amplificación del fragmento del gen *pol* que codifica para PR y RT usando buffer de lisis y solución salina estéril para eluir las gotas de sangre seca en papel filtro.

	No. Perforaciones GSS	Amplificación en la PCR	
		Tiempo de elución	
		2h	3h
Muestra GSS-MQC-112 eluida con buffer de lisis AVL	2	+	+
	3	+	+
	4	+	*
Muestra GSS-MQC-112 eluida en solución salina	2	+	+
	3	+	+
	4	+	*

*No se realiza

El porcentaje de amplificación de la PCR fue del 54,4% correspondiendo a en seis (6) GSS-MQC, en donde de cinco de ellas (01, 08, 141, 148 y 159) fueron almacenadas a 4°C, incluyendo los remanentes incubados a esta temperatura. De las muestras incubadas a temperatura ambiente el porcentaje de amplificación fue del 36,4% correspondiendo a cuatro (4) GSS-MQC (01, 141, 148 y 155) de los cuales el GSS-MQC-155 amplifica únicamente en el remanente incubado por tres días como se evidencia en la tabla 14.

Tabla 14 Resultado de la amplificación del fragmento del gen *pol* que codifica para PR y RT comparando el tiempo y temperatura del almacenamiento de la muestra de GSS.

Cod. Muestra	Carga viral Dil 1:2	Refrigeración (4°C)				Temperatura ambiente		
		1 día	3 días	15 días	remanentes 24 h*3 días	1 día	15 días	remanentes 24 h*3 días
GSS-MQC-141	746.524	+	+	+	+	+	+	+
GSS-MQC-155	150.000	-	-	-	-	-	-	+
GSS-MQC-08	53.730	+	+	+	+	-	-	-
GSS-MQC-03	47.035	-	-	-	-	-	-	-
GSS-MQC-148	41.332	+	+	+	+	+	+	-
GSS-MQC-01	36.400	+	+	+	+	+	-	+
GSS-MQC-06	12.238	-	-	-	-	-	-	-
GSS-MQC-07	12.021	-	-	-	-	-	-	-
GSS-MQC-159	7.352	+	+	+	+	-	-	-
GSS-MQC-18	5.008	-	-	-	-	-	-	-
GSS-MQC-02	1.070	-	-	-	-	-	-	-

6.2 Objetivo específico 2

6.2.1 Sensibilidad analítica o límite de detección de la PCR

Para la matriz plasma se obtuvo producto de PCR del tamaño esperado hasta la dilución 1/1024 de la muestra MQC-021 como se observa en la figura 16, lo cual corresponde a una carga viral teórica de 742 copias/ml como se evidencia en la tabla 15.

Figura 16. Determinación del límite de detección de la PCR o sensibilidad analítica usando plasma como matriz.

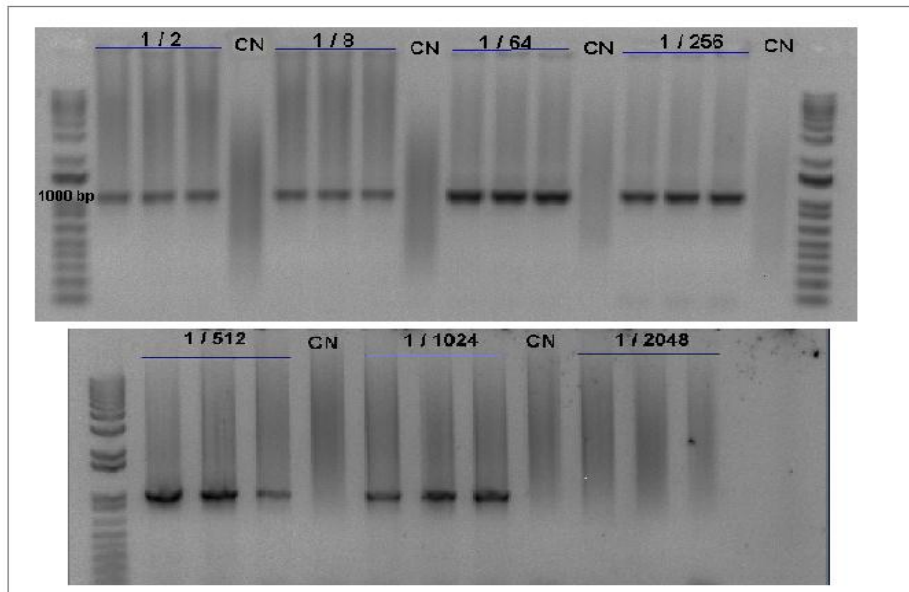


Tabla 15. Resultado de la prueba de límite de detección o sensibilidad analítica de la PCR en plasma

	Dilución seriada de la muestra											
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
	carga viral inicial Copias/ml	Carga viral teorica copias/ml										
Muestra MQC-021	759817	379909	189954	94977	47489	23744	11872	5936	2968	1484	742	371
Replica 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Replica 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Replica 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Para la matriz de sangre seca (GSS) en papel filtro se obtuvo un producto del tamaño esperado en las tres réplicas de la dilución 1/128 de la muestra MQC-GSS- 021 como se observa en la figura 17, lo cual corresponde a una carga viral teórica de 5 936 copias/ml como se evidencia en la tabla 16.

Figura 17. Determinación del límite de detección de la PCR o sensibilidad analítica usando Gota de sangre seca como matriz.

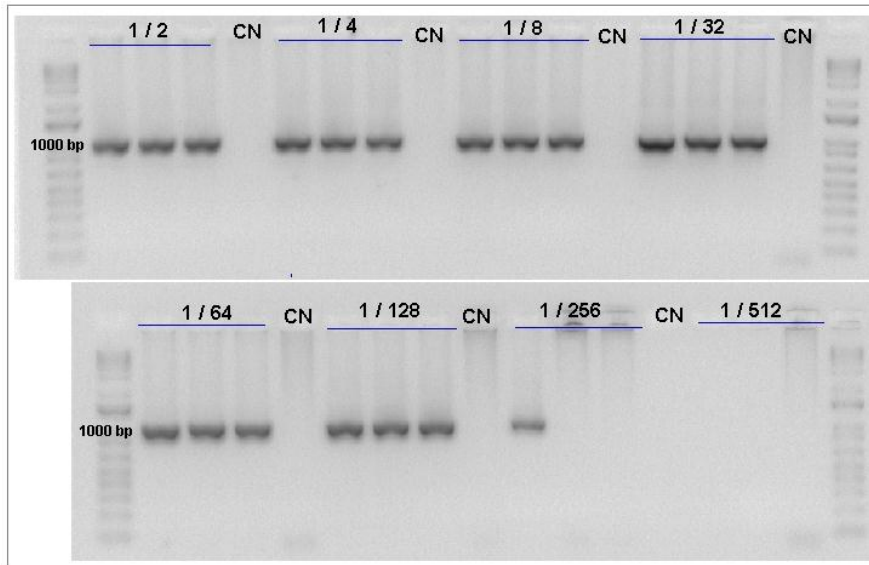


Tabla 16 Resultado de la prueba de límite de detección o sensibilidad analítica de la PCR en papel filtro

Muestra GSS-MQC- 021	Dilución seriada de la muestra											
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
	carga viral inicial Copias/ml	Carga viral teorica copias/ml										
	759817	379909	189954	94977	47489	23744	11872	5936	2968	1484	742	371
Replica 1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Replica 2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Replica 3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

6.2.2 Análisis de Precisión

En el análisis de precisión, se determinó el porcentaje de similitud de nucleótidos de 32 réplicas intracorrida (véase tabla 17), obteniendo una media entre las secuencias de nucleótidos del 99,94% (IC 95% entre 99,88 y

100%). Se evidenció 14 sustituciones de nucleótidos de las cuales 13 son ambiguas y una sustitución es no sinónima (A por G en el nucleótido 819 del MQC-112) (véase tabla 18)

Tabla 17. Número de nucleótidos similares obtenidos entre replicas intracorrida.

Código Muestra	No. Nucleótidos obtenidos en la secuencia			\bar{X}
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	
MQC-117	937	937		937
MQC-8	942	942	942	942
MQC-163	854	854		854
MQC-175	846	846		846
MQC-103	937	937		937
MQC-01	938	935		936,5
MQC-02	935	935		935
MQC-15	928	927		927,5
MQC-36	890	890		890
MQC-112	902	903	895	900
MQC-07	939	939		939
MQC-30	791	791		791
MQC-18	935	935		935
MQC-146	935	935		935
MQC-155	940	939		939,5

Tabla 18. Precisión en la secuencia de nucleótidos, aminoácidos y mutaciones de farmacorresistencia.

Código Muestra	No. Nucleótidos obtenidos en la secuencia	% de acuerdo	\bar{x} % de nucleótidos	Posición cambio de nucleótido	Tipo de cambio del nucleótido		No. aa obtenidos en la secuencia	% de acuerdo	\bar{x} % de aminoácidos	Posición cambio de aa	Sustitución	No. Mutaciones de farmacorresistencia			No. Mutaciones discordantes
					Sustitución	Delección						Replica 1	Replica 2	Replica 3	
MQC-117	937	100 ± 0,00%					311	100 ± 0,00%				11	11		0
MQC-8	942	100 ± 0,00%					312	100 ± 0,00%				13	13	13	0
MQC-163	854	100 ± 0,00%					283	100 ± 0,00%				15	15		0
MQC-175	846	100 ± 0,00%					280	100 ± 0,00%				17	17		0
MQC-103	938	100 ± 0,00%					311	100 ± 0,00%				18	18		0
MQC-01	938	99,68 ± 2,12%		212	T	Y	311	99,03 ± 2,12		71	V ?	18	18		0
				276	A	R				92	Q ?				0
				672	G	R				224	R ?				0
MQC-02	935	100 ± 0,00%					310	100 ± 0,00%				16	16		0
MQC-15	928	99,89 ± 0,70%		621	A	M	308	99,67 ± 0,70		207	V ?	17	17		0
MQC-36	890	100 ± 0,00%	99,92				295	100 ± 0,00%	99,85			13	13		0
MQC-112	902	99,67 ± 4,35%	99,88 -100 (IC 95%)	591	A	R	299	98,88 ± 4,04	99,66-100 IC 95%	197	A ?	22	22	25	3
				601	A	M				201	K ?				0
				642	C	Y				214	Y ?				0
				666	C	Y				222	Y ?				0
				780	A	R				260	Q ?				0
				819	G	A				268	V E				0
				861	T	y				287	Y ?				0
				888	A	R				296	Q ?				0
				918	A	R				306	Q ?				0
MQC-07	939	100					311	100 ± 0,00%				18	18		0
MQC-30	791	100					261	100 ± 0,00%				15	15		0
MQC-18	935	100					311	100 ± 0,00%				14	14		0
MQC-146	935	100					310	100 ± 0,00%				12	12		0
MQC-155	940	99,89 ± 0,70		690		Y	311	100 ± 0,00%				13	13		0

En la precisión de las secuencias de aminoácidos se obtuvo de las 32 réplicas de las 15 MQC (véase tabla 19) una media en el porcentaje de acuerdo en similitud del 99,85% (IC 95% entre 99,66 y 100%), evidenciando 12 sustituciones de aminoácidos ambiguas y la sustitución de una valina (V) por un ácido glutámico (E) (aminoácido 268 del MQC-112) (véase tabla 17).

Tabla 19. Número de aminoácidos similares obtenidos entre replicas intracorrida.

Código Muestra	No. Aminoácidos obtenidos en la secuencia			\bar{X}
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	
MQC-117	311	311		311
MQC-8	310	310	310	310
MQC-163	283	283		283
MQC-175	280	280		280
MQC-103	311	311		311
MQC-01	311	308		309,5
MQC-02	310	310		310
MQC-15	308	307		307,5
MQC-36	295	295		295
MQC-112	298	298	291	298
MQC-07	311	311		311
MQC-30	261	261		261
MQC-18	311	311		311
MQC-146	310	310		310
MQC-155	311	311		311

Tabla 20. Porcentaje de similitud en secuencias de nucleótidos de réplicas intercorrida.

Código Muestra	No. Nucleótidos obtenidos en la secuencia	% de acuerdo	\bar{x} % de nucleótidos Corrida 1	No. Nucleótidos obtenidos en la secuencia		\bar{x}	% de nucleótidos	\bar{x} % de nucleótidos Corrida 2
				Replica 1	Replica 2			
MQC-117	937	100 ± 0,0	99,92 99,88 -100 (IC 95%)	937	937	937	100 ± 0,0	99,93 99,87 - 100 IC (95%)
MQC-8	942	100 ± 0,0		942	942	942	100 ± 0,0	
MQC-103	938	100 ± 0,0		938	938	938	100 ± 0,0	
MQC-01	938	99,6 ± 2,2		938	935	936,5	99,68 ± 2,1	
MQC-02	935	100 ± 0,0		935	935	935	100 ± 0,0	
MQC-15		99,8 ± 0,70		928	927	927,5	99,89 ± 0,7	
MQC-36	890	100 ± 0,0		890	890	890	100 ± 0,0	
MQC-112	902	99,6 ± 4,3		839	837	838	99,76 ± 1,4	
MQC-07	939	100 ± 0,0		939	939	939	100 ± 0,0	
MQC-18	935	100 ± 0,0		935	935	935	100 ± 0,0	
MQC-146	935	100 ± 0,0		935	935	935	100 ± 0,0	
MQC-155	940	99,8 ± 0,70		940	939	939,5	99,89 ± 0,70	

En la precisión intermedia de nucleótidos, se determinó un 99,93% con un intervalo de confianza de 99,87 a 100% (véase tabla 20) de similitud entre réplicas de 12 MQC, el cual difiere en 0,01% a la media del porcentaje de similitud de nucleótidos obtenidos en la corrida 1 (99,92%). En la prueba de t student para dos muestras se determinó que no existe diferencia significativa entre las secuencias de nucleótidos intercorrida (Véase tabla 21,22 y23)

Tabla 21. Media y desviación estándar entre las secuencias de nucleótidos intra e intercorrida.

Código Muestra	Corrida 1					Corrida 2			
	No. Nucleótidos obtenidos en la secuencia			\bar{x}	σ	No. Nucleótidos obtenidos en la secuencia		\bar{x}	σ
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			Replica 1	Replica 2		
MQC-117	937	937		937	0	937	937	937	0
MQC-8	942	942	942	942	0	942	942	942	0
MQC-103	937	937		937	0	938	938	938	0
MQC-01	938	935		936,5	2,12	938	935	936,5	2,12
MQC-02	935	935		935	0	935	935	935	0
MQC-15	928	927		927,5	0,707	928	927	927,5	0,70
MQC-36	890	890		890	0	890	890	890	0
MQC-112	902	903	895	900	4,359	839	837	838	1,41
MQC-07	939	939		939	0	939	939	939	0
MQC-18	935	935		935	0	935	935	935	0
MQC-146	935	935		935	0	935	935	935	0
MQC-155	940	939		939,5	0,707	940	939	939,5	0,70

Tabla 22. Prueba de F para varianzas de dos muestras

	<i>Corrida 1</i>	<i>Corrida 2</i>
Media	929,4	924,3
Varianza	275,7	930,5
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	0,29	
P(F<=f) una cola	0,027	
Valor crítico para F (una cola)	0,35	

Ho= No hay diferencia entre las varianzas de las dos corridas realizadas.

Ha= Existe diferencia entre las varianzas de las dos corridas

$F = 0,29 < \text{valor crítico para F o F tabulado} = 0,35$.

Asume no existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de las dos corridas.

Tabla 23. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	<i>Corrida 1</i>	<i>Corrida 2</i>
Media	929,4	924,3
Varianza	275,7	930,5
Observaciones	12	12
Varianza agrupada	603,1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	22	
Estadístico t	0,50	
P(T<=t) una cola	0,30	
Valor crítico de t (una cola)	1,71	
P(T<=t) dos colas	0,61	
Valor crítico de t (dos colas)	2,07	

Ho= No hay diferencia entre las medias de las dos corridas.

Ha= Existe diferencia entre las medias de las dos corridas.

T (12)=1.96; p= 0,6 > 0,05

No existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las secuencias de nucleótidos intercorrida.

En la precisión intermedia de aminoácidos, se determinó un 99,83% con un intervalo de confianza de 99,64 a 100% (véase tabla 24) de similitud entre réplicas de 12 MQC, el cual difiere en 0,04% a la media del porcentaje de similitud de nucleótidos obtenidos en la corrida 1 (99,79%). En la prueba de t student para dos muestras se determinó que no existe diferencia significativa entre las secuencias de aminoácidos intercorrida (Véase tabla 25,26 y27).

En la precisión intermedia de aminoácidos, se determinó una similitud entre réplicas de 12 MQC de 99,83% con un intervalo de confianza de 99,64 a 100% (véase tabla 24) de, el cual difiere en 0,04% a la media del porcentaje de similitud de nucleótidos obtenidos en la corrida 1 (99,79%). En la prueba de t student para dos muestras se determinó que no existe diferencia significativa entre las secuencias de aminoácidos intercorrida (Véase tabla 25,26 y27).

Tabla 24. Porcentaje de similitud en secuencias de aminoácidos de réplicas intercorrida.

Código Muestra	No. aminoácidos obtenidos en la secuencia	% de acuerdo	\bar{x} % de aminoácidos Corrida1	No. aminoácidos obtenidos en la secuencia		\bar{X}	% de aminoácidos	\bar{x} % de aminoácidos Corrida 2
				Replica 1	Replica 2			
MQC-117	311	100 ± 0,0	99,79 99,60- 99,97 (IC 95%)	311	311	311	100 ± 0,0	99,8 99,64 - 100 (IC 95%)
MQC-8	312	100 ± 0,0		312	312	312	100 ± 0,0	
MQC-103	311	100 ± 0,0		311	311	311	100 ± 0,0	
MQC-01	311	99,0 ± 2,12		311	308	309,5	99,03 ± 2,12	
MQC-02	310	100 ± 0,0		310	310	310	100 ± 0,0	
MQC-15	308	99,67 ± 0,70		308	307	307,5	99,67 ± 0,70	

MQC-36	295	100 ± 0,0		295	295	295	100 ± 0,0	
MQC-112	299	98,88 ± 4,04		279	277	278	99,28 ± 1,41	
MQC-07	311	100 ± 0,00%		311	311	311	100 ± 0,00%	
MQC-18	311	100 ± 0,00%		310	310	310	100 ± 0,00%	
MQC-146	310	100 ± 0,00%		310	310	310	100 ± 0,00%	
MQC-155	311	100 ± 0,00%		312	312	312	100 ± 0,00%	

Tabla 25. Media y desviación estándar entre las secuencias de aminoácidos intra e intercorrida.

Cód. Muestra	No. Aminoácidos obtenidos en la secuencia			\bar{x}	σ	CV %	CV% Max	No. Aminoácidos obtenidos en la secuencia		\bar{x}	σ	CV%	CV% Max
	Replica 1	Replica 2	Replica 3					Replica 1	Replica 2				
MQC-117	311	311		311	0,0	0,0	1,4%	311	311	311	0	0,0	0,7%
MQC-8	310	310	310	310	0,0	0,0		312	312	312	0	0,0	
MQC-103	311	311		311	0,0	0,0		311	311	311	0	0,0	
MQC-01	311	308		309,5	2,1	0,7		311	308	309,5	2,1	0,7	
MQC-02	310	310		310	0,0	0,0		310	310	310	0	0,0	
MQC-15	308	307		307,5	0,7	0,2		308	307	307,5	0,7	0,2	
MQC-36	295	295		295	0,0	0,0		295	295	295	0	0,0	
MQC-112	298	298	291	298	4,0	1,4		279	277	278	1,4	0,5	
MQC-07	311	311		311	0,0	0,0		311	311	311	0	0,0	
MQC-18	311	311		311	0,0	0,0		310	310	310	0	0,0	
MQC-146	310	310		310	0,0	0,0		310	310	310	0	0,0	
MQC-155	311	311		311	0,0	0,0		312	312	312	0	0,0	

Tabla 26. Prueba de F para varianzas de dos muestras

	<i>Corrida 1</i>	<i>Corrida 2</i>
Media	307,9	306,4
Varianza	29,8	101,1
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	0,29	
P(F<=f) una cola	0,027	
Valor crítico para F (una cola)	0,35	

Dado que el estadístico $F = 0,29$ es menor que el valor crítico $= 0,35$ y que la probabilidad de estadístico $p=0,027$ es superior a $0,025$, podemos asumir que las varianzas no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 27. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales.

	<i>Corrida 1</i>	<i>Corrida 2</i>
Media	307,9	306,4
Varianza	29,8	101,1
Observaciones	12	12
Varianza agrupada	65,49	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	22	
Estadístico t	0,45	
P(T<=t) una cola	0,32	
Valor crítico de t (una cola)	1,71	
P(T<=t) dos colas	0,65	
Valor crítico de t (dos colas)	2,07	

El estadístico $t = 0,45$ se encuentra dentro de la zona de aceptación de la hipótesis nula (valor del estadístico p (dos colas) $0,65$, concluyendo que no

existe diferencia estadísticamente significativa entre las secuencias de aminoácidos intercorrida.

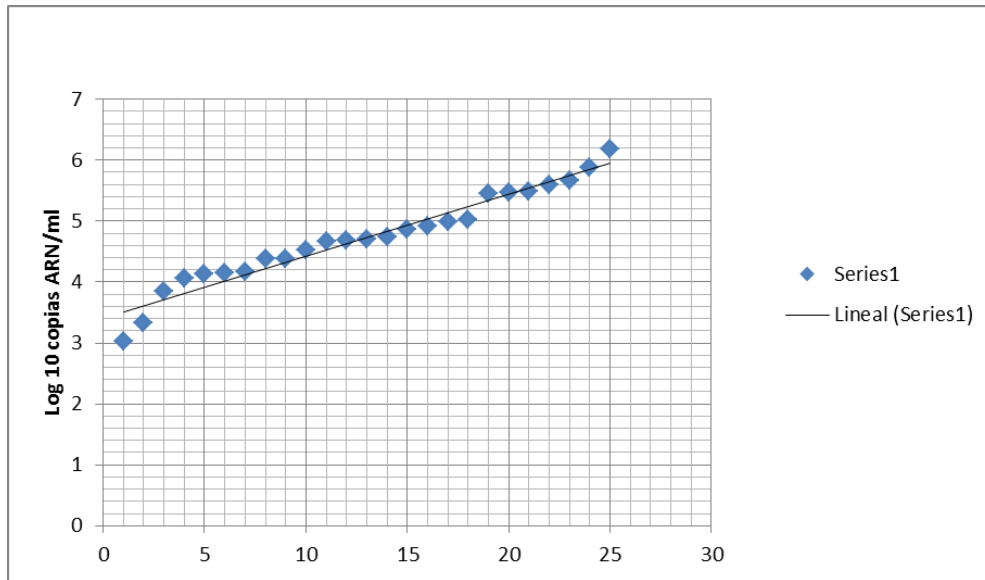
6.2.3 Linealidad

Con respecto a la linealidad se determinó que se puede obtener una secuencia de nucleótidos de buena calidad, que se concreta en el análisis de concordancia entre las secuencias CFE e INS desde la carga viral 1084 copias/ml hasta 1493047 copias/ml (representación gráfica tabla 28 y figura 18).

Tabla 28. Linealidad de la técnica in house.

Código Muestra	Copias de ARN/ml	Log10 copias ARN/ml	Código Muestra	Copias de ARN/ml	Log10 copias ARN/ml
MQC-CFE-021 dil 1/512	1084	3,03	MQC-CFE-030	55740	4,74
MQC-CFE-002	2139	3,33	MQC-CFE-001	72.800	4,86
MQC-CFE-163	6998	3,84	MQC-CFE-148	82663	4,91
MQC-CFE-036	11592	4,06	MQC-CFE-118	96954	4,98
MQC-CFE-146	13450	4,12	MQC-CFE-008	107460	5,03
MQC-CFE-175	14180	4,15	MQC-CFE-026	278832	5,44
MQC-CFE-159	14703	4,16	MQC-CFE-155	300000	5,47
MQCCFE-007	24041	4,38	MQC-CFE-015	307803	5,48
MQC-CFE-006	24476	4,38	MQC-CFE-112	394490	5,59
MQC-CFE-018	33826	4,52	MQC-CFE-103	455341	5,65
MQC-CFE-116	45756	4,66	MQC-CFE-021	759817	5,88
MQC-CFE-123	48579	4,68	MQC-CFE-141	1493047	6,17
MQC-CFE-117	50221	4,70			

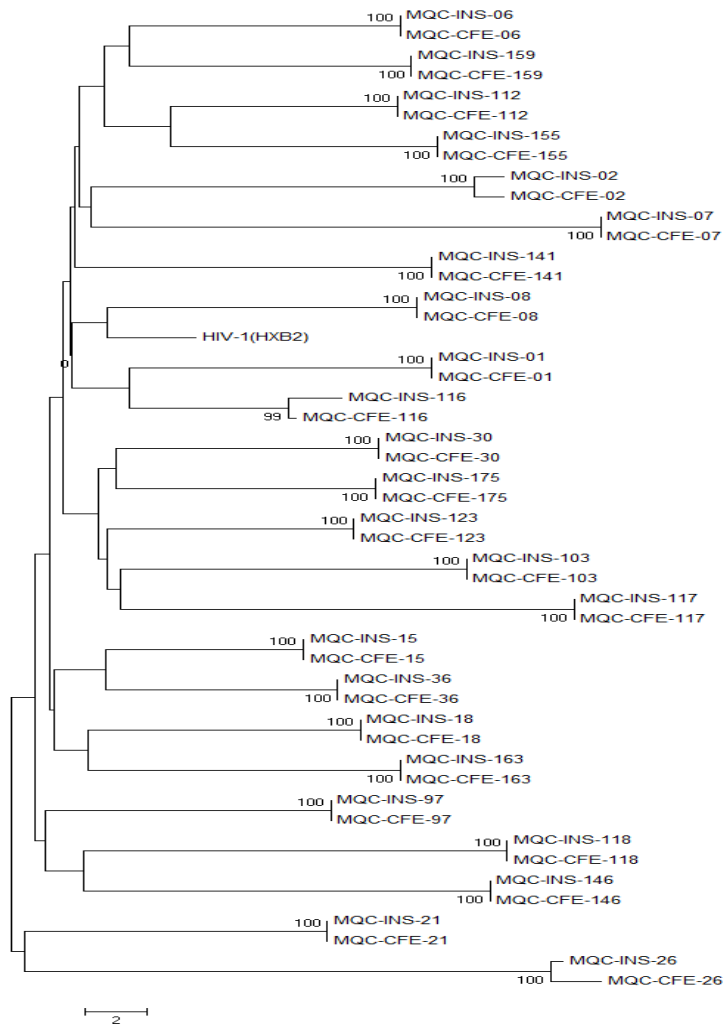
Figura 18. Linealidad en la secuenciación Vs carga viral de la muestra



6.3 Objetivo específico 3

Todas las secuencias obtenidas con la técnica *in-house* en desafío se alinean al 100% con las obtenidas en el CFE como se observa en la figura 19.

Figura 19. Similitud entre las secuencias obtenidas en el INS Vs la técnica *in-house* del CFE. Dendrograma obtenido con el método Neihborg Joining, modelo No. of differences (0.5).



Las mutaciones de aminoácidos asociadas a farmacorresistencia (DRMs) obtenidas con los dos métodos (*in-house* Vs CFE) se evidencian en la tabla 30, demostrando un alto nivel de concordancia con un índice kappa de 0,96. La sensibilidad de la técnica corresponde al 92,7% y su especificidad al 99,97%. El valor predictivo positivo corresponde al 99,42% y el valor predictivo negativo al 99,6% como se evidencia en la tabla 29.

Tabla 29 .Tabla de contingencia para determinar concordancia entre los DMRs detectados por la técnica in-house vs la técnica de CFE.

		Técnica in-House CFE		
		Positivo	Negativo	Total
Técnica in House INS	Positivo	345	2	347
	Negativo	27	6805	6832
	Total	372	6807	7179

Sensibilidad: 92,7%

Especificidad: 99,97%

Valor predictivo positivo: 99,42%

Valor predictivo negativo: 99,6%

Índice Kappa: 0,96

Tabla 30. Mutaciones de aminoácidos asociados a farmacorresistencia obtenidas con los dos métodos in-house vs CFE.

Código	Mutaciones gen que codifica para la Proteasa	Mutaciones gen que codifica para la Transcriptasa	Resistencia ARV
MQC-CFE-01	A71AV, E35D, N37D, L63P, I72E, V77I, I93L	K20R, V35IV, V60I, D86N, A98S, V118I, K122P, D177E, I195IL , G196E, T200IT , E203DE , R211KR, F214L, V245AEKT, K249KR, I293V, P294T, E297EK, I329V, G333EG, Q334FLPS, A360T, K390R, T397AT	S
MQC-INS-01	E35D, N37D, L63P, A71AV, I72E, V77I, I93L	K20R, V35I, V60I, D86N, A98S, V118I, K122P, D177E, G196E, R211RK, F214L	S
MQC-CFE-02	I13V, E35D, R41K, D60E, L63P, I64V	K49R, I50V, V60I, V118I, K122E, D123N, P133S , T165V, D177E, R211K, F214L, K275KQ, K277KR, P294T, E297K, I329L, M357T, T369A	S
MQC-INS-02	I13V, E35D, R41K, D60E, L63P, I64V	K49R, I50V, V60I, V118I, K122E, D123N, S134N , T165V, D177E, R211K, F214L	S
MQC-CFE-06	A71V, K14R, N37S, L63P, I72E, V77I, I93IL	V21I, V35M, T39E, E40EK , V60I, D86E, I135T, I142V, R211K, A272P, T286A, E297A, V314I, D324E, F346H, M357T, A376T	S
MQC-INS-06	K14R, N37S, L63P, A71T, I72E, V77I, I93L	V21I, V35M, T39E, V60I, D86E, I135T, I142V, R211K	S
MQC-CFE-07	Q58E, I13V, L19V, E35D, N37S, R57K, D60E, I62V, L63P, I66IV	A62V, V35L, I50V, T69A, K122EK, D123E, L205LV, D250E, K277KR, I293V, P294T, E297K, I329L, E344D, R356K, M357L, A360V, K366R, T369AT, Q373HQ, I375IV, T377M	S
MQC-INS-07	Q58E, I13V, L19V, E35D, N37S, R57K, D60E, I62V, L63P	A62V, V35L, I50V, T69A, K122KE, D123E	S
MQC-CFE-08	I15V, G16E, E35D, R57K, Y59F, D60E, Q61D, L63T, I72T	D123E, I135T, D177E, V179I	S
MQC-INS-08	I15V, G16E, E35D, R57K, Y59F, D60E, Q61D, L63T, I72T	D123E, I135T, D177E, V179I	S
MQC-CFE-15	Q58E, A71V, G16E, N37S, P39K, K43KR, D60DE , I62V, L63A, I72E, V77I, I93L	A98S, K122E, I135T, G196E, Q207N, R211K, V245D, A272P, Q278H, I293V, P294A, E297EG, I329L, A376S, K390R, A400S	S
MQC-INS-15	Q58E, G16E, N37S, P39K, K43R, I62V, L63A, A71V, I72E, V77I, I93L	A98S, K122E, I135T, G196E, Q207N, R211K	S
MQC-CFE-18	I13V, E35D, N37Q, R41K, L63P, I93L	K20R, V60I, D123N, I135M, S162D, Q197P, R211K	S
MQC-INS-18	I13V, E35D, N37Q, R41K, L63P, I93L	V179D, K20R, V60I, D123N, I135M, S162D, Q197P, R211K	S
MQC-CFE-21	T12N, I13IV , G16E, N37ST, P39S, L63ST, I64IV , I72V, V77I	T215L, K32T, V35R, V118I, I135T, S162C, T200A, R211K, F214L, Y271FY, A272P, V276I, K281KR, E291D, V292IV, E297AE,	S

		K311KR, Q334L, M357IM, R358K, K390R, K395KR, E399D	
MQC-INS-21	T12N, G16E, N37S, P39S, L63T, I72V, V77I	K32T, V35R, V118I, I135T, S162C, T200A, R211K, F214L	S
MQC-CFE-26	K14Q, I15V, G16E, K20M, E35D, M36I, R41K, R57K, Q61N, L63A, E65Q, L89I, I93L	D86E, D123E, I135V, S162C, E169D, K173A, Q174K, Q207E, R211K	S
MQC-INS-26	K14Q, I15V, G16E, K20M, E35D, M36I, R41K, R57K, Q61N, L63A, E65Q, L89I, I93L	D86E, V118VI, D123E, I135V, S162C, E169D, K173A, Q174K	S
MQC-CFE-30	L10I, V11IV, I13V, I15V, G16E, L19I, M36I, P39T, I62V, L63Q, V82IV, L89M	V35I, S48T, V60I, K122E, I135T, D177E, Q207H, R211K	S
MQC-INS-30	L10I, I13V, I15V, G16E, L19I, M36I, P39T, I62V, L63Q, L89M	V35I, S48T, V60I, K122E, I135T	S
MQC-CFE-36	G16E, N37S, P39K, D60E, I62V, L63P, I64V, I72V, V77I	K101KR, I142IT, I178M, G196E, R211K, V245Q, V276I, I293V, P294T, K311R, Q334E, A376S, K390R, A400S	S
MQC-INS-36	N37S, P39K, D60E, I62V, L63P, I64V, I72V, V77I	K101R, I142T, I178M, G196E, R211K	S
MQC-CFE-97	L63T, I72V, V77I, P79PQ	K20KR, D123E, I135T, S162HY, D177E, V179I, R211K, A272S, A288S, I293V, K311KR, G333E, Q334H, G359S, T369A, A371V, S379G, K390R, E396DE	S
MQC-INS-97	L63T, I72V, V77I	D123E, I135T, S162H, D177E, V179I	S
MQC-CFE-103	T12P, K14R, I15V, G16EG, R41K, D60E, L63A, V77I, I93L	K103N, K20KR, K32N, V35I, A98S, K102Q, K122E, I135K, S162C, R211K, A272P, T286A, I293V, P294S, E297K, A304E, P345Q, F346Y, K347R, T377V	R:EFV y NVP
MQC-INS-103	T12P, K14R, I15V, R41K, D60E, L63A, V77I, I93L	K103N, K20R, K32N, V35I, A98S, K102Q, K122E, I135K, S162C, R211K	R:EFV y NVP
MQC-CFE-112	L10IL, A71AT, I13V, K14R, I15V, L19Q, E35D, N37DN, Q61HQ, L63P, I64V, H69Q, I72IV	V35M, T39AT, V60I, S68G, T69N, V118I, K122E, I135T, T139A, I202V, R211K, F214L, T215ST, A272AP, T286A, I293V, V317A, I329V, Q334E, M357R, R358K, K366R, A371V, T377L, K390R	S
MQC-INS-112	A71AT, I13V, K14R, I15V, L19Q, E35D, N37D, L63P, I64V, H69Q, I72V	V35M, V60I, S68G, T69N, V118I, K122E, I135T, T139A, I202V, R211K, F214L	S
MQC-CFE-116	L10I, N37D, R41H, I62IV, L63P, C67S, I93L	K32KR, A98S, K122E, E169D, I178IM, G196E, T200AT, Q207E	S
MQC-INS-116	**	A98S, K122E, E169D, I178M, G196E, T200A, Q207E	S
MQC-CFE-117	L19E, N37A, L63AP, E65DE, I72R	K103N, V35L, V60I, A98S, I142LR, R211K, S251N, A272P, T286A, V292I, K311KR, I329L, P345Q, F346Y, M357T, R358K, K366R, A376S, T386IT, K390R	R:EFV y NVP

MQC-INS-117	L19E, N37A, L63P, E65D, I72R	K103N, V35L, V60I, A98S, I142R, R211K	R:EFV Y NVP
MQC-CFE-118	E35D, M36I, R41K, L63C, I72V, V82I	K32Q, V35M, T39AT, E40D, D121H, K122E, I135R, S162CW, D177E, I202IV, Q207E, R211K, F214L, A272P, K277KR, T286P, A288S, I293V, E297R, I326V, F346Y, K366R	S
MQC-INS-118	E35D, M36I, R41K, L63C, I72V, V82I	K32Q, V35M, T39TA, E40D, D121H, K122E, I135R, S162C, D177E, Q207E, R211K, F214L	S
MQC_CFE-123	I13V, I15V, L19Q, R41KR, Q58EQ, L63A	K122E, I135T, K173E, A272P, K277R, I293V, Q373T, T377Q, K390R	S
MQC-INS-123	Q58E, I13V, I15V, L19Q, L63A	K122E, I135T, K173E	S
MQC-CFE-141	K14K, I15V, R41N, D60E, L63A, K70R, I72V	V90I, V179E, D86E, K102Q, K104T, K166R, Q197K, T200A, I202V, R211KR, V245E, E248DE, D250DE, A272P, K277R, L283I, I293V, E297R, P345KPQT, R356K, S379GS, K385R, T386I, K390R	S
MQC-INS-141	I15V, R41N, D60E, L63A, K70R, I72V	V179E, D86E, V90I, K102Q, K104T, K166R, Q197K, T200A, I202V, R211RK	S
MQC-CFE-146	G17DE, Q18EQ, N37S, R41K, I62V, L63P, V77I, I93L	I178M, T200S, I202IV, Q207E, H208HY, V245E, A272P, I293V, P294T, I329L, G333D, R356K, A360T, V365I, A376S, K390KR, A400S	PBR: EFV, ETR, NVP, RPV
MQC-INS-146	G17E, Q18EQ, N37S, R41K, I62V, L63P, V77I, I93L	I178M, T200S, I202V, Q207E	PBR: EFV, ETR, NVP, RPV
MQC-CFE-155	T12S, N37A, I62V, L63P, V77I, I93L	T69N, S68G, K102KR, K122EK, D123DN, I135IT, S162C, Q207E, V245E, A272P, T286AT, E297EK, E312T, D324P, Q334LQ, M357T, R358K, G359S, S379G, V381I, K390R	S
MQC-INS-155	T12S, N37A, I62V, L63P, V77I, I93L	S68G, T69N, K122KE, I132X, I135IT, S162C, Q207E	S
MQC-CFE-159	L10I, I13V, K14R, I15V, G16E, K20M, M36I, L38LV, P39LPS, R41K, R57KR, I62V, L63H, I64V, I72V, I93L	V35M, V118IV, D121HY, K122D, D123E, I142V, S162A, K166KR, D177E, T200A, R211Q, F214L, V245M, A272P, K277R, V292I, I293V, P321PS, S322T, Q334L, M357T, A376AS, T377	S
MQC-INS-159	L10I, I13V, K14R, I15V, G16E, K20M, M36I, L38LV, P39L, R41K, R57K, I62V, L63H, I64V, I72V, I93L	V35M, V118I, D121H, K122D, D123E, I142V, S162A, D177E, T200A, R211Q, F214L	S
MQC-CFE-163	T12N, L19I, M36I, P39S, R41K, R57KR, D60DE, I62IV, L63PS	K20R, V35T, S48T, V60I, I135V, S162A, D177E, L210FL, T215DE	BNR: AZT
MQC-INS-163	T12N, L19I, M36I, P39S, R41K, R57KR, I62V, L63P	K20R, V35T, S48T, V60I, I135V, S162A, D177E, L210F, T215D	BNR: AZT
MQC-CFE-175	I13V, G16E, K20R, M36I, P39S, I62V, L63S, I64V, E65D	E138A, K238T, K20R, D86E, D123E, I135V, S162C, K173Q, I202V, A272P, K275KR, K277KR, Q278HQ, T286A, I293V, P294T, E297K, G335D, M357T, S379G, T386I,	RI: EFV, PBR: ETR, RPV

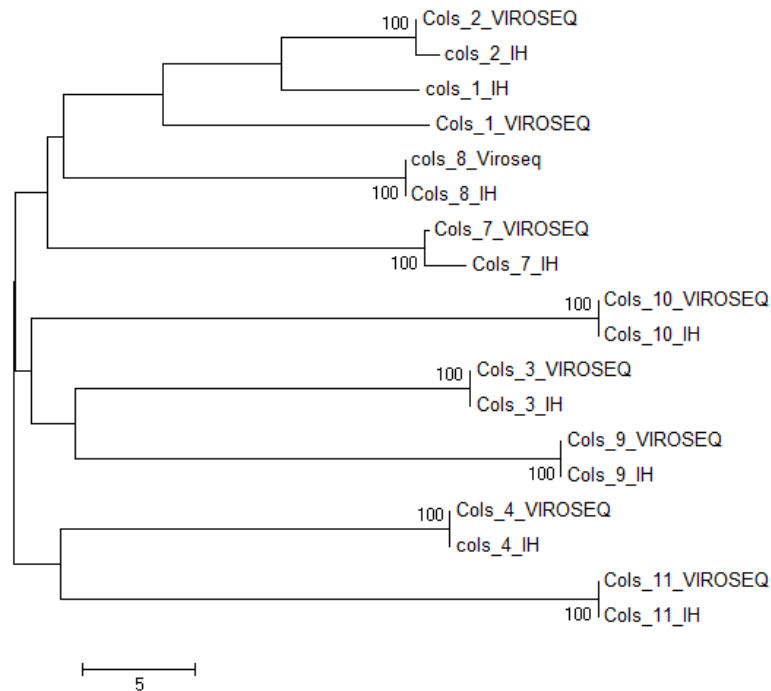
		A400S	
MQC-INS-175	I13V, G16E, K20R, M36I, P39S, I62V, L63S, I64V, E65D	E138A, K20R, D86E, D123E, I135V, S162C, K173Q, I202V	PBR: ETR,RPV

S: susceptible; R: resistentes; RI: resistencia intermedia; BNR: bajo nivel de resistencia; PBR: potencial baja resistencia.

6.4 Objetivo específico 4

Todas las secuencias obtenidas con la técnica *in-house* en desafío alinean al 100% con las obtenidas por la técnica ViroSeq como se observa en la figura 20.

Figura 20. Similitud entre las secuencias obtenidas en el INS Vs la técnica ViroSeq. Dendrograma obtenido con el método Neihborg Joining, modelo No. of differences (0.5).



Las mutaciones de aminoácidos asociadas a farmacorresistencia (DRMs) obtenidas con los dos métodos (*in-house* Vs CFE) se evidencian en la tabla 32, demostrando un alto nivel de concordancia con un índice kappa de 0,96. La sensibilidad de la técnica corresponde al 92,7% y su especificidad al 100%. El valor predictivo positivo corresponde al 100% y el valor predictivo negativo al 99,5% como se evidencia en la tabla 31.

Tabla 31. Tabla de contingencia para determinar concordancia entre los DMRs detectados por la técnica *in-house* vs ViroSeq.

		Técnica ViroSeq		
		Positivo	Negativo	Total
Técnica in House INS				
	Positivo	166	0	166
	Negativo	13	2566	2579
	Total	179	2566	2745

Sensibilidad: 92,7%

Especificidad: 100,0%

Valor predictivo positivo: 100%

Valor predictivo negativo: 99,5%

Índice Kappa: 0,96

Tabla 32. Mutaciones de aminoácidos asociados a farmacorresistencia obtenidas con los dos métodos in-house vs CFE.

Código	Mutaciones gen que codifica para la Proteasa	Mutaciones gen que codifica para la Transcriptasa	Resistencia ARV
Cols-1-Viroseq	I13IV, I15V, L19I, M36I, N37D, R41K, I62V, L63P, I93L	M184V, V118VI, D123E, I135T, S162C, Q174E, T200A, R211G, T286A, A288S, E297A, E328Q, Q334L	BNR: ABC; ANR: FTC, 3TC
ols-1- IH	L19I, M36I, N37D, R41K, I62V, L63P	M184V, V118I, D123E, I135T, S162C, Q174E, T200A, R211G	BNR: ABC ANR: FTC, 3TC
Cols-2-Viroseq	L10I, T12P, L19I, E35D, M36I, N37D, D60E, I62V, L63P, C67S	M184V, L74V, K103N, Y181C, H221HY, V35I, K101R, D123DE, I135T, E169D, L210F, V245Q, D250E, S251N, A272P, K277R, I293V, E297A, K311KR, S322T, G335S	ANR: ABC, FTC, 3TC, EFV, NVP, RPV RI: ETR
Cols-2-IH	L10I, T12P, L19I, E35D, M36I, N37D, D60E, I62V, L63P, C67S	K65R, M184V, L74V, K103N, Y181C, V35I, K101R, I135T, E169D, L210F	ANR: ABC, FTC, 3TC, EFV, NVP. RI: ETR, RPV
Cols-3-Viroseq	T12P, K14R, G16E, M36I, P39S, I62V, L63P, I72IV, V77I	K65R, K70K, M184V, T215L, L100I, K103N, K20R, E28EK, S68G, K102R, K122E, D123DA, I135T, I142IT, D177G, V189VI, G196E, T200A, R211K, F214L, A272P, I293V, V317A, I326L	ANR: ABC, FTC, 3TC, TDF, EFV, NVP, RVP RI: ETR
Cols-3-IH	T12P, K14R, G16E, M36I, P39S, I62V, L63P, I72IV, V77I	K65R, M184V, T215L, L100I, K103N, K20R, S68G, K102R, K122E, I135T, D177G, V189I, G196E, T200A, R211K, F214L	ANR: ABC, FTC, 3TC, EFV, NVP, RVP RI: TDF, ETR
Cols-4-Viroseq	I15V, E35D, N37, R41K, L63Q, I64V, V77I, I93L	L74V, M184V, L100I, K103N, K122E, I142V, I178M, T200A, R211K	ANR: ABC, FTC, 3TC, EFV, NVP, RPV RI: ETR
Cols-4-IH	I15V, E35D, N37, R41K, L63Q, I64V, V77I, I93L	L74V, M184V, L100I, K103N, K122E, I142V, I178M, T200A, R211K	ANR: ABC, FTC, 3TC, EFV, NVP, RPV RI: ETR
Cols-7-Viroseq	T12TP, I13IV, L19LI, R41I, D60S, I62V, L63P, I64V, I72V, Q92K	V35I, I135T, K173KQ, P176PL, V179VI, T200T, Q207ADNT, R211K, V245VEKM, A272AP, K277R, T286TA, E291ED, I293IV, E297Q, S322ST, I329IV	s

Cols-7-IH	T12TP, L19LI, R41I, D60S, I62V, L63P, I64V, I72V, Q92K	V35I, I135T, P176PL, V179VI	s
Cols-8- Viroseq	K14S, I15V, L19Q, M36I, D60E, I62V, I64V	M184V, V179D, D123DE, I135T, S162C, Q174K, D177E, T200A, R211K, A288S, I 293V, P294A, I326V, I329V, Q33 4N	ANR: FTC, 3TC, BNR: ABC PBNR: EFV, NVP, ETR, RVP
Cols-8-IH	K14S, I15V, L19Q, M36I, D60E, I62V, I64V	M184V, V179D, I135T, S162C, Q174K, D177E, T 200A, R211K	ANR: FTC, 3TC, BNR: ABC PBNR: EFV, NVP, ETR, RVP
Cols-9- Viroseq	T12P, K14R, L63P, I72E, V77I, I93L	M184V, T215Y, K103N, E28K, V35M, K101Q, K102R, I135T, I178M, T200E, Q207E, R211K, V245E, T286A, P294Q, K311R, D320DE, S322AE, D324E, L325LI	BNR: ABC ANR: FTC, 3EFV, NVP RI: AZT
Cols-9-IH	T12P, K14R, L63P, I72E, V77I, I93L	M184V, T215Y, K103N, E28K, V35M, K101Q, K102R, I135T, I178M, T200E, Q207E, R211K	BNR: ABC ANR: FTC, 3EFV, NVP RI: AZT
Cols-10- Viroseq	I15V, G16E, K20M, M36MI, N37K, R41K, I62V, L63T, E65D, K70R	L74V, V75VA , M184V, K101P, V179IL, G190S, V35T, V60I, E79ED, K122E, I135T, I142V, S162A, P170S, T200A, Q207E, F214L, K275KR, Q278H, T286A, E297K, K311, S322T, D324E	ANR: ABC, FTC, 3TC, EFV, ETR, NVP, RPV
Cols-10- IH	I15V, G16E, K20M, M36MI, N37K, R41K, I62V, L63T, E65D, K70R	L74V, M184V, K101P, V179IL, G190S, V35T, V60I, E79ED, K122E, I135T, I142V, S162A, P170S, T200A, Q207E, F214L	ANR: ABC, FTC, 3TC, EFV, ETR, NVP, RPV
Cols-11- Viroseq	K20R, N37S, R41K, L63P, H69Y, I72E	M184V, V179D, G190A, E28EG, V35T, T39TK, V60I, K102Q, K103R, D1 23E, I135L, K173N, G196R, T20 0A, A272P, K311R, I326V, I329V	ANR: FTC, 3TC, EFV, NVP RI: RPV BNR: ABC, ETR
Cols-11- IH	N37S, R41K, L63P, H69Y, I72E	V8I, V35T, V60I, K102Q, K103R, D123E, I135L, K173N, G196R, T200A	s

S: susceptible; R: resistentes; RI: resistencia intermedia; BNR: bajo nivel de resistencia; PBR: potencial resistencia.

7 DISCUSIÓN

La genotipificación de mutaciones en la región que codifica la proteasa y transcriptasa inversa del VIH-1 es el método de referencia mundial para la vigilancia de resistencia transmitida y adquirida del virus a fármacos antirretrovirales. Los laboratorios que implementan métodos de genotipificación in-house al igual que otros métodos de diagnóstico requieren de evaluación que confirmen su desempeño con respecto al uso previsto asegurando la calidad de los resultados, los cuales podrían verse afectados por cambios no sinónimos en la secuencia de nucleótidos obtenida, generando falsos positivos o negativos en la detección de mutaciones asociadas a farmacorresistencia. El modelo de validación recomendado por la OMS se basa en la determinación de la precisión (repetibilidad y precisión intermedia), límite de detección (sensibilidad analítica de la PCR) y linealidad asociada a la capacidad de amplificar el fragmento del gen esperado en muestras con diferentes cargas virales. La precisión es una medida de dispersión se determina hallando la desviación estándar o coeficiente de variación de réplicas en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad para evaluar ensayos de tipo cuantitativo. La técnica genotipificación para VIH-1 es de tipo cualitativo por lo cual requiere que los datos obtenidos, es decir secuencias de nucleótidos, aminoácidos y mutaciones asociadas a farmacorresistencia sean transformados a datos cuantitativos teniendo en cuenta el número de discrepancias observadas en réplicas de muestras analizadas intra e intercorrida. El número de muestras estipulado por OMS es de tres (3) a cinco (5) cada una con cinco (5) réplicas, en este estudio se obtuvo la precisión a partir de dos y tres réplicas de 15 y 12 MQC intra e intercorrida respectivamente, robusteciendo su análisis con el aumento en el número de MQC analizados, considerando que el volumen de la muestra, el costo y tiempo empleado para realizar este ensayo hace que un número de cinco replicas este sobredimensionado con la realidad del uso rutinario en el laboratorio. Según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) una secuencia de buena calidad es aquella que tiene un número mínimo de bases ambiguas (CLSI, 2018), con los resultados obtenidos se pudo demostrar que la técnica in house empleada tiene excelente precisión en condición de repetibilidad y reproducibilidad teniendo en cuenta la variable tiempo con un porcentaje de acuerdo en réplicas intracorrida del 99,94% (IC 95% entre 99,88 y 100%) y del 99,85% (IC 95% entre 99,66 y 100%) para nucleótidos y aminoácidos respectivamente e intercorrida de 99,93% (IC 99,87 a 100%) y 99,83% (IC 99,64 a 100%) de similitud para la secuencias de nucleótidos y aminoácidos, cuyos resultados son análogos a los reportados en estudios anteriores de $99,68 \pm 0,16$ (Acharya et al., 2014) y 99.4% (Inzaule et al., 2013) de similitud entre nucleótidos de réplicas intracorrida y de $99.1\% \pm 0.59\%$ (Inzaule et al., 2013) y $99.76 \pm 0.18\%$

(Acharya et al., 2014) para la secuencia de nucleótidos de réplicas intercorrida.

Se han reportado métodos de genotipificación *in-house* para VIH-1 con sensibilidad analítica de 1000 copias de ARN/ml (Acharya et al., 2014) en plasma y un porcentaje de amplificación >95% en muestras con cargas virales entre 253 y 3 264 850 copias de ARN (Inzaule et al., 2013). Para muestras de sangre seca en papel filtro (GSS) el porcentaje de amplificación en la PCR es de hasta el 90% en pacientes que tienen una carga viral superior a 100000 copias de ARN/ml en plasma, asumiendo que en gotas de sangre seca en papel filtro este valor corresponde a 500 copias/ml (Parkin et al., 2012) controlando las condiciones de temperatura y humedad durante su almacenamiento y transporte. Las muestras almacenadas a temperatura ambiente (8 a 30°C) han demostrado una estabilidad por dos semanas (S. Bertagnolio et al., 2007) y a 4°C hasta por 12 meses (Youngpairaj et al., 2008). En este ejercicio el límite de detección es de 740 y 5936 copias de ARN/ml para plasma y GSS respectivamente, según el producto de PCR observado con electroforesis, sin embargo en plasma se obtuvo secuencias de buena calidad desde 1084 copias de ARN/ml, el cual debe ser tomado como un valor aproximado ya que estos datos son obtenidos a partir de la dilución de una muestra sugiriendo que la carga viral es un dato teórico. El porcentaje de amplificación observado en muestras de GSS cuando la muestra se conserva a 4°C fue del 60%, no obstante se esperaba que fuera aun mayor, ya que solo dos de las 11 MQC-GSS fortificados, tenían cargas virales por debajo o muy cercano al límite de detección establecido en este estudio. Lo anterior puede estar relacionado a que no se realizó algún ejercicio de estandarización con el volumen de eluido a utilizar para la extracción de ARN o a la degradación parcial del ARN viral ((S. Bertagnolio et al., 2007).

Con respecto a la sensibilidad de la PCR asociada al genotipo de VIH-1 se observó un resultado satisfactorio, ya que se obtuvo producto de PCR para los tres genotipos B, F y CRF-02AG, sin embargo para esta última cepa recombinante no se logró obtener una secuencia de alta calidad, debido a la baja concentración de ADN la cual se evidenció por electroforesis. En cuanto las muestras de plasma en pacientes con tratamiento se obtuvo un porcentaje de amplificación del 90.9%.

El ensayo de genotipificación comercial ViroSeq al igual que el ensayo *in-house* empleado por el CFE amplifican toda la región que codifica para toda

la proteasa (1-99 codones) y un fragmento de la transcriptasa inversa (RT) de 335 y 400 codones respectivamente. El análisis de concordancia de las DRMs (mutaciones de farmacoresistencia) en este estudio se limitó al resultado obtenido con el algoritmo del programa HIV db program y a la región secuenciada por el ensayo in house en desafío con la cual se obtuvo toda la región de la proteasa y de 1-215±25 codones que codifican para la retrotranscriptasa inversa. Se observó un alto nivel de concordancia (índice kappa 0,96) de las DMRs entre las secuencias obtenidas con la técnica aplicada en este estudio Vs CFE y Viroseq, sin embargo la pérdida de algunos aminoácidos en los extremos de la secuencias afectó la puntuación de resistencia específica para algunos fármacos y no el cambio no sinónimo de nucleótidos, generó la omisión de alto nivel de resistencia específicamente para emtricitabine (FTC), lamiduvina (3TC) en la muestra Cols-11-IH y resistencia intermedia para efavirenz (EFZ) en la MQC-CFE-17, además de la disminución del nivel de resistencia de alto a intermedio para rilvoparina (RPV) y tenofovir (TDF) en las muestras Cols-2- IH y Cols-3- IH, resistencia intermedia RPV y bajo nivel de resistencia de etravirine (ETR) a potencial bajo nivel de resistencia de la muestra Cols-11-IH.

8 CONCLUSIONES

Se puede concluir que el método de genotipificación en desafío:

- Cumple con el uso previsto identificando mutaciones en la región que codifica para la proteasa y parte de transcriptasa inversa asociadas a la resistencia de fármacos antirretrovirales dirigidos a inhibir estas enzimas virales.
- Permite amplificar el genoma viral en muestras de plasma con cargas virales de 1084 copias hasta 1493047 en plasma demostrando la linealidad de la técnica.
- Tiene un alto nivel de precisión disminuyendo la posibilidad de encontrar mutaciones inducidas por errores no sinónimos durante la amplificación.
- Permite la obtención de secuencias en VIH-1 del subtipo F, diferente al subtipo B.
- Es útil en muestras de pacientes con y sin previa exposición a fármacos antirretrovirales.

- Es altamente concordante con la técnica in-house implementada en el Centro para la Excelencia en VIH / SIDA (CFE) en Vancouver-Canadá, laboratorio acreditado por la OMS para la vigilancia de farmacorresistencia en VIH-1.
- Los resultados son equiparables a los obtenidos con la técnica comercial ViroSeq aun cuando el fragmento que codifica para la transcriptasa inversa obtenido tenga un menor número de codones.

Por lo anterior, la validación esta técnica *in-house* representa un avance significativo para el Instituto Nacional de salud de Colombia permitiendo la introducción de la genotipificación del VIH-1 como estrategia de monitoreo de farmacorresistencia a nivel nacional.

9 BIBLIOGRAFIA

- Acharya, A., Vaniawala, S., Shah, P., Misra, R. N., Wani, M., & Mukhopadhyaya, P. N. (2014). Development, validation and clinical evaluation of a low cost in-house HIV-1 drug resistance genotyping assay for Indian patients. *PLoS One*, 9(8), e105790. doi:10.1371/journal.pone.0105790
- Agapkina, J., Yanvarev, D., Anisenko, A., Korolev, S., Vepsalainen, J., Kochetkov, S., & Gottikh, M. (2014). Specific features of HIV-1 integrase inhibition by bisphosphonate derivatives. *Eur J Med Chem*, 73, 73-82. doi:10.1016/j.ejmech.2013.11.028
- Aids Study Group of the Spanish Society of Infectious Diseases, C. M. t. N. A. P. (2016). Executive summary of the GESIDA/National AIDS Plan Consensus Document on Antiretroviral Therapy in Adults Infected by the Human Immunodeficiency Virus (Updated January 2016). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 34(7), 439-451. doi:10.1016/j.eimc.2016.02.028
- Alamos, N. s. (2017). **HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs)**. Retrieved from www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html
- Allen, W. J., & Rizzo, R. C. (2012). Computer-Aided Approaches for Targeting HIVgp41. *Biology (Basel)*, 1(2), 311-338. doi:10.3390/biology1020311
- Ammaranond, P., & Sanguansittianan, S. (2012). Mechanism of HIV antiretroviral drugs progress toward drug resistance. *Fundam Clin Pharmacol*, 26(1), 146-161. doi:10.1111/j.1472-8206.2011.01009.x

- Antell, G. C., Dampier, W., Aiamkitsumrit, B., Nonnemacher, M. R., Jacobson, J. M., Pirrone, V., . . . Wigdahl, B. (2016). Utilization of HIV-1 envelope V3 to identify X4- and R5-specific Tat and LTR sequence signatures. *Retrovirology*, 13(1), 32. doi:10.1186/s12977-016-0266-9
- Bermejo, M., Sanchez-Palomino, S., Usan, L., & Alcamí, J. (2004). Dynamics of HIV replication in lymphocytes and the efficacy of protease inhibitors. *J Med Virol*, 73(4), 502-507. doi:10.1002/jmv.20118
- Bertagnolio, S., Parkin, N. T., Jordan, M., Brooks, J., & Garcia-Lerma, J. G. (2010). Dried blood spots for HIV-1 drug resistance and viral load testing: A review of current knowledge and WHO efforts for global HIV drug resistance surveillance. *AIDS Rev*, 12(4), 195-208. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21179184>
- Bertagnolio, S., Parkin, NT, Jordan, M., Brooks, J., García-Lerma, JG. (2010). Dried blood spots for HIV-1 drug resistance and viral load testing: A review of current knowledge and WHO efforts for global HIV drug resistance surveillance. *AIDS*, 12 (4), 195-208.
- Bertagnolio, S., Soto-Ramirez, L., Pilon, R., Rodriguez, R., Viveros, M., Fuentes, L., . . . Sandstrom, P. (2007). HIV-1 drug resistance surveillance using dried whole blood spots. *Antivir Ther*, 12(1), 107-113. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17503754>
- Blackard, J. T., Cohen, D. E., & Mayer, K. H. (2002). Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis*, 34(8), 1108-1114. doi:10.1086/339547
- Boireau, S., Maiuri, P., Basyuk, E., de la Mata, M., Knezevich, A., Pradet-Balade, B., . . . Bertrand, E. (2007). The transcriptional cycle of HIV-1 in real-time and live cells. *J Cell Biol*, 179(2), 291-304. doi:10.1083/jcb.200706018
- Briggs, J. A., & Krausslich, H. G. (2011). The molecular architecture of HIV. *J Mol Biol*, 410(4), 491-500. doi:10.1016/j.jmb.2011.04.021
- CAC. (2017). *Situación del VIH en Colombia 2016* (2344-7702). Retrieved from https://cuentadealtocosto.org/site/images/Publicaciones/2018/Situacion_VIH_2017..pdf
- Castro, A. C., Borges, L. G., Souza Rda, S., Grudzinski, M., & D'Azevedo, P. A. (2008). Evaluation of the human immunodeficiency virus type 1 and 2 antibodies detection in dried whole blood spots (DBS) samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 50(3), 151-156. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604415>
- CLSI, C. a. I. s. i. (2018). MM18-Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by targeted DNA secuencing. Retrieved from https://clsi.org/media/2333/mm18-ed2_sample.pdf
- Cuellar, N. (2017). *INFORME DEL COMPORTAMIENTO EN LA NOTIFICACIÓN DE VIH-SIDA HASTA EL*

- PERIODO EPIDEMIOLOGICO III DEL AÑO 2017*. Retrieved from <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/VIH-SIDA%20%20PE%20VII%202017.pdf>
- Chew, K. K., Ng, K. Y., Khong, W. X., Kaur, P., Yap, J. K., Chua, A., . . . Ng, O. T. (2012). 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. *Ann Acad Med Singapore*, 41(12), 553-558. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303111>
- Chong, H., Wu, X., Su, Y., & He, Y. (2016). Development of potent and long-acting HIV-1 fusion inhibitors. *AIDS*, 30(8), 1187-1196. doi:10.1097/QAD.0000000000001073
- Dewdney, T. G., Wang, Y., Kovari, I. A., Reiter, S. J., & Kovari, L. C. (2013). Reduced HIV-1 integrase flexibility as a mechanism for raltegravir resistance. *J Struct Biol*, 184(2), 245-250. doi:10.1016/j.jsb.2013.07.008
- Diaz, C. A. M., M; Lenis, W. (2010). Antiretroviral drug resistance in HIV-infected patients in Colombia. *Int J Infect Dis*, 14(4), e298-303. doi:10.1016/j.ijid.2009.05.006
- Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*, 10(4), 279-290. doi:10.1038/nrmicro2747
- Engelman, A., Kessl, J. J., & Kvaratskhelia, M. (2013). Allosteric inhibition of HIV-1 integrase activity. *Curr Opin Chem Biol*, 17(3), 339-345. doi:10.1016/j.cbpa.2013.04.010
- Eurolab España, P. P. M. y. c. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 1. Retrieved from www.eurachem.org
- Famiglioni, V., & Silvestri, R. (2016). Focus on Chirality of HIV-1 Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Molecules*, 21(2). doi:10.3390/molecules21020221
- Foley, B. T., Apetrei, C., Mizrachi, I., Rambaut, A., Korber, B., Leitner, T., Hahn, B., Mullins, J., Wolinsky, S. (2016). HIV Sequence Compendium 2016. Retrieved from <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2016/sequence2016.pdf>
- Foley, B. T., Leitner, T., Paraskevis, D., & Peeters, M. (2016). Primate immunodeficiency virus classification and nomenclature: Review. *Infect Genet Evol*, 46, 150-158. doi:10.1016/j.meegid.2016.10.018
- Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol*, 13(8), 484-496. doi:10.1038/nrmicro3490
- Gall, A., Ferns, B., Morris, C., Watson, S., Cotten, M., Robinson, M., . . . Kellam, P. (2012). Universal amplification, next-generation sequencing,

- and assembly of HIV-1 genomes. *J Clin Microbiol*, 50(12), 3838-3844. doi:10.1128/JCM.01516-12
- Ganser-Pornillos, B. K., Yeager, M., & Sundquist, W. I. (2008). The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol*, 18(2), 203-217. doi:10.1016/j.sbi.2008.02.001
- Giroud, C., Chazal, N., Gay, B., Eldin, P., Brun, S., & Briant, L. (2013). HIV-1-associated PKA acts as a cofactor for genome reverse transcription. *Retrovirology*, 10, 157. doi:10.1186/1742-4690-10-157
- Guerrero, S., Batisse, J., Libre, C., Bernacchi, S., Marquet, R., & Paillart, J. C. (2015). HIV-1 replication and the cellular eukaryotic translation apparatus. *Viruses*, 7(1), 199-218. doi:10.3390/v7010199
- Gummuluru, S., Pina Ramirez, N. G., & Akiyama, H. (2014). CD169-dependent cell-associated HIV-1 transmission: a driver of virus dissemination. *J Infect Dis*, 210 Suppl 3, S641-647. doi:10.1093/infdis/jiu442
- Holmes, M., Zhang, F., & Bieniasz, P. D. (2015). Single-Cell and Single-Cycle Analysis of HIV-1 Replication. *PLoS Pathog*, 11(6), e1004961. doi:10.1371/journal.ppat.1004961
- ICTV. (2015, 2015/july). Virus Taxonomy: 2015 Release. Retrieved from <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
- INECC-CCA. (2010). *Guía para la implantación, validación y verificación del desempeño continuo de un método analítico*. Retrieved from http://www.academia.edu/10184972/Guia_implantacion_validacion_y_verificacion_de_metodos_analiticos_inecc_2013
- InfoSIDA. (2017). *Medicamentos contra el VIH autorizados por la FDA*. Retrieved from <https://infosida.nih.gov/education-materials/fact-sheets/21/58/medicamentos-contra-el-vih-autorizados-por-la-fda>
- Inzaule, S., Yang, C., Kasembeli, A., Nafisa, L., Okonji, J., Oyaró, B., . . . Zeh, C. (2013). 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. *J Clin Microbiol*, 51(2), 529-539. doi:10.1128/JCM.02347-12
- Jacob, D. T., & DeStefano, J. J. (2008). A new role for HIV nucleocapsid protein in modulating the specificity of plus strand priming. *Virology*, 378(2), 385-396. doi:10.1016/j.virol.2008.06.002
- Jetzt, A. E., Yu, H., Klarmann, G. J., Ron, Y., Preston, B. D., & Dougherty, J. P. (2000). High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol*, 74(3), 1234-1240. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627533>
- Jia, L., Li, L., Gui, T., Liu, S., Li, H., Han, J., . . . Li, J. (2016). Analysis of HIV-1 intersubtype recombination breakpoints suggests region with high pairing probability may be a more fundamental factor than sequence similarity affecting HIV-1 recombination. *Virology*, 13(1), 156. doi:10.1186/s12985-016-0616-1

- Kijak, G. H., & McCutchan, F. E. (2005). HIV diversity, molecular epidemiology, and the role of recombination. *Curr Infect Dis Rep*, 7(6), 480-488. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16225787>
- Kramer V, W. M. (2015). Resistance against inhibitors of HIV-1 entry into target cells. *Future Virol*, 10-2, 97-112.
- Laith, Q., Mawsawi, Al., Neamati, N. (2007). Blocking interactions between HIV-1 integrase and cellular cofactors: an emerging anti-retroviral strategy. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 28 No 10, 526-535. doi:10.1016/j.tips.2007.09.005
- Laiton, K., Instituto Nacional de salud. (2015). Secuenciación de ADN por el método SANGER en analizador genético ABI 3130. Retrieved from <http://www.ins.gov.co:16994/sig/Redes%20en%20Salud%20Pblica/ME N-R01.5380-034.pdf>
- Lee, J. H., Leaman, D. P., Kim, A. S., Torrents de la Pena, A., Sliepen, K., Yasmeen, A., . . . Ward, A. B. (2015). Antibodies to a conformational epitope on gp41 neutralize HIV-1 by destabilizing the Env spike. *Nat Commun*, 6, 8167. doi:10.1038/ncomms9167
- Loret, E. P., Georgel, P., Johnson, W. C., Jr., & Ho, P. S. (1992). Circular dichroism and molecular modeling yield a structure for the complex of human immunodeficiency virus type 1 trans-activation response RNA and the binding region of Tat, the trans-acting transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(20), 9734-9738. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1409690>
- Lucic, B., & Lusic, M. (2016). Connecting HIV-1 integration and transcription: a step toward new treatments. *FEBS Lett*, 590(13), 1927-1939. doi:10.1002/1873-3468.12226
- LVM-UFRJ, (2014). *RENAGENO IN HOUSE. Metodologia de desenvolvimento próprio PR e RT*. Laboratório de virologia molecular. Instituto de Biología- Departamento de genética. Universidad Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
- Martin, V., Perales, C., Fernandez-Algar, M., Dos Santos, H. G., Garrido, P., Pernas, M., . . . Briones, C. (2016). An Efficient Microarray-Based Genotyping Platform for the Identification of Drug-Resistance Mutations in Majority and Minority Subpopulations of HIV-1 Quasispecies. *PLoS One*, 11(12), e0166902. doi:10.1371/journal.pone.0166902
- Maueia, C., Costa, D., Meggi, B., Ismael, N., Walle, C., Curvo, R., . . . Ferreira, O. C., Jr. (2011). Frequency of human immunodeficiency virus type-2 in hiv infected patients in Maputo City, Mozambique. *Virology*, 8, 408. doi:10.1186/1743-422X-8-408
- Menendez-Arias, L. (2013). Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: overview and recent developments. *Antiviral Res*, 98(1), 93-120. doi:10.1016/j.antiviral.2013.01.007

- Metzner, K. J. (2016). HIV Whole-Genome Sequencing Now: Answering Still-Open Questions. *J Clin Microbiol*, 54(4), 834-835. doi:10.1128/JCM.03265-15.
- MINSALUD, OPS (2016) ssr 8. estudio sobre fármaco- resistencia al vih-1 en personas sin exposición previa a los medicamentos antirretrovirales, en 12 entidades territoriales y bogotá, distrito capital. Ministerio de la protección social; OPS. Organización panamericana de la salud.
- Mitsuya, H., Yarchoan, R., & Broder, S. (1990). Molecular targets for AIDS therapy. *Science*, 249(4976), 1533-1544. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1699273>.
- Monleau, M., Montavon, C., Laurent, C., Segondy, M., Montes, B., Delaporte, E., . . . Peeters, M. (2009). Evaluation of different RNA extraction methods and storage conditions of dried plasma or blood spots for human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance testing. *J Clin Microbiol*, 47(4), 1107-1118. doi:10.1128/JCM.02255-08
- Morse, G. D., Nanzigu, Sarah. (2015). *Frontiers in HIV Research : HIV Enzyme Inhibitors and Antiretroviral Therapy*. 1, 7-9.
- Moseri, A., Schnur, E., Noah, E., Zherdev, Y., Kessler, N., Singhal Sinha, E., . . . Anglister, J. (2014). NMR observation of HIV-1 gp120 conformational flexibility resulting from V3 truncation. *FEBS J*, 281(13), 3019-3031. doi:10.1111/febs.12839
- Motomura, K., . Chen, J., Hu, W. S., (2008). Genetic recombination between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2, two distinct human lentiviruses. *Virology*, 82 (4), 1923-1933.
- Mouscadet, J. F., Delelis, O., Marcelin, A. G., & Tchertanov, L. (2010). Resistance to HIV-1 integrase inhibitors: A structural perspective. *Drug Resist Updat*, 13(4-5), 139-150. doi:10.1016/j.drug.2010.05.001
- Najera, R., Delgado, E., Perez-Alvarez, L., & Thomson, M. M. (2002). Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS*, 16 Suppl 4, S3-16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12698994>
- Nisole, S., & Saib, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*, 1, 9. doi:10.1186/1742-4690-1-9
- NSA-2. (2012). *HIV and SIV Nomenclature*. Retrieved from www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HelpDocs/subtypes-more.html
- ONUSIDA. (2015). *El Sida en cifras 2015*. Retrieved from [www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS by the numbers 2015 es.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS_by_the_numbers_2015_es.pdf)
- ONUSIDA. (2016). *Hoja informativa Noviembre de 2016*. Retrieved from www.unaids.org/es/resources/fact-sheet
- Parkin, N., de Mendoza, C., Schuurman, R., Jennings, C., Bremer, J., Jordan, M. R., . . . Group, W. D. G. W. (2012). Evaluation of in-house genotyping assay performance using dried blood spot specimens in

- the Global World Health Organization laboratory network. *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 4, S273-279. doi:10.1093/cid/cir982
- Parra, J., Álvarez, M., Checa, N., Peña, A., Pasquau, J., López, C., Maroto, M., Hernández, J., García F.. (2009). Resistencias genotípicas en pacientes con VIH-1 y grados de viremia persistentemente bajos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27 (2), 75-80.
- Poveda, E. (2015). HIV tropism shift: new paradigm on cell therapy strategies for HIV cure. *AIDS Rev*, 17(1), 65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25608470>
- Prellwitz, I. (2014). *DETERMINAÇÃO DO ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO (HLA) A, B E C POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1 DOS SUBTIPOS B, C E RECOMBINANTES NO SUL DO BRASIL* Rio de Janeiro. Retrieved from [http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Determinacao_d_o_antigeno_leucocitario_humano_\(HLA\)_A_B_E_POR_sequenciamento_Prellwita_Isabel_Maria.pdf](http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Determinacao_d_o_antigeno_leucocitario_humano_(HLA)_A_B_E_POR_sequenciamento_Prellwita_Isabel_Maria.pdf)
- Rhee, S. Y., Jordan, M. R., Raizes, E., Chua, A., Parkin, N., Kantor, R., . . . Shafer, R. W. (2015). HIV-1 Drug Resistance Mutations: Potential Applications for Point-of-Care Genotypic Resistance Testing. *PLoS One*, 10(12), e0145772. doi:10.1371/journal.pone.0145772
- Rodríguez j., R. O., Maldonado A.,-Alvarez M., Muñoz O, Torres R., Vazquez G., Lira R. (2015). Use of Dried Plasma Spots for HIV-1 Viral Load Determination and Drug Resistance Genotyping in Mexican Patients. *BioMed Research International*, 1-9.
- Rottinghaus, E., Bile, E., Modukanele, M., Maruping, M., Mine, M., Nkengasong, J., & Yang, C. (2013). Comparison of Ahlstrom grade 226, Munktell TFN, and Whatman 903 filter papers for dried blood spot specimen collection and subsequent HIV-1 load and drug resistance genotyping analysis. *J Clin Microbiol*, 51(1), 55-60. doi:10.1128/JCM.02002-12
- Rottinghaus, E. K., Ugbeno, R., Diallo, K., Basse, O., Azeez, A., Devos, J., . . . Yang, C. (2012). Dried blood spot specimens are a suitable alternative sample type for HIV-1 viral load measurement and drug resistance genotyping in patients receiving first-line antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*, 54(8), 1187-1195. doi:10.1093/cid/cis015
- Roux, K. H., & Taylor, K. A. (2007). AIDS virus envelope spike structure. *Curr Opin Struct Biol*, 17(2), 244-252. doi:10.1016/j.sbi.2007.03.008
- Sakuragi, S., Yokoyama, M., Shioda, T., Sato, H., & Sakuragi, J. I. (2016). SL1 revisited: functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 genome RNA. *Retrovirology*, 13(1), 79. doi:10.1186/s12977-016-0310-9
- Sluis-Cremer, N., Arion, D., & Parniak, M. A. (2000). Molecular mechanisms of HIV-1 resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors

- (NRTIs). *Cell Mol Life Sci*, 57(10), 1408-1422. doi:10.1007/PL00000626
- Sonar, V. P., Corona, A., Distinto, S., Maccioni, E., Meleddu, R., Fois, B., . . . Cottiglia, F. (2017). Natural product-inspired esters and amides of ferulic and caffeic acid as dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Eur J Med Chem*, 130, 248-260. doi:10.1016/j.ejmech.2017.02.054
- Stanford, U. (2019). HIV Drug resistance database. Retrieved from <https://hivdb.stanford.edu/>
- Suzuki, Y., & Craigie, R. (2007). The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol*, 5(3), 187-196. doi:10.1038/nrmicro1579
- Van Lint, C., Bouchat, S., & Marcello, A.** (2013). HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology*, 10, 67. doi:10.1186/1742-4690-10-67
- Vella, S., & Palmisano, L. (2005). The global status of resistance to antiretroviral drugs. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 4, S239-246. doi:10.1086/430784
- Vemula, S. V., Veerasamy, R., Ragupathy, V., Biswas, S., Devadas, K., & Hewlett, I. (2015). HIV-1 induced nuclear factor I-B (NF-IB) expression negatively regulates HIV-1 replication through interaction with the long terminal repeat region. *Viruses*, 7(2), 543-558. doi:10.3390/v7020543
- Vlach, J., Garcia, A., Jacque, J. M., Rodriguez, M. S., Michelson, S., & Virelizier, J. L. (1995). Induction of Sp1 phosphorylation and NF-kappa B-independent HIV promoter domain activity in T lymphocytes stimulated by okadaic acid. *Virology*, 208(2), 753-761. doi:10.1006/viro.1995.1207
- Wainberg, M. A., Mesplede, T., & Quashie, P. K. (2012). The development of novel HIV integrase inhibitors and the problem of drug resistance. *Curr Opin Virol*, 2(5), 656-662. doi:10.1016/j.coviro.2012.08.007
- WHO. (2010). *WHO/HIVResNet HIV drug resistance*. Retrieved from http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hiv_reslab_strategy.pdf
- WHO. (2012). *Manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens*. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75829/1/WHO_HIV_2012.30_eng.pdf?ua=1
- WHO. (2017a). *VIH/SIDA*. Retrieved from http://www.who.int/topics/hiv_aids/es/
- WHO. (2017b). *VIH/Sida Red Mundial sobre Farmacorresistencia del VIH*. Retrieved from <http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/hivresnet/es/>
- Youngpairoj, A. S., Masciotra, S., Garrido, C., Zahonero, N., de Mendoza, C., & Garcia-Lerma, J. G. (2008). HIV-1 drug resistance genotyping from dried blood spots stored for 1 year at 4 degrees C. *J Antimicrob Chemother*, 61(6), 1217-1220. doi:10.1093/jac/dkn100

- Zhao, R. Y., Li, G., & Bukrinsky, M. I. (2011). Vpr-host interactions during HIV-1 viral life cycle. *J Neuroimmune Pharmacol*, 6(2), 216-229. doi:10.1007/s11481-011-9261-z
- Zhou, Z., Wagar, N., DeVos, J. R., Rottinghaus, E., Diallo, K., Nguyen, D. B., . . . Yang, C. (2011). Optimization of a low cost and broadly sensitive genotyping assay for HIV-1 drug resistance surveillance and monitoring in resource-limited settings. *PLoS One*, 6(11), e28184. doi:10.1371/journal.pone.0028184
- Zhuang, J., Jetzt, A. E., Sun, G., Yu, H., Klarmann, G., Ron, Y., . . . Dougherty, J. P. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol*, 76(22), 11273-11282. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388687>