



UNIVERSIDAD DE PANAMA

VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO

**DETECCION DE MUTACIONES QUE CONFIEREN RESISTENCIA A
DROGAS ANTIRETROVIRALES EN POBLACIONES MINORITARIAS DE
VIH-1 EN PLASMA**

CLAUDIA M GONZALEZ V

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR POR
EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

TUTOR

DR. JUAN MIGUEL PASCALE

PANAMA, REPUBLICA DE PANAMA

2017

51

HOJA DE APROBACION

Los miembros del Jurado Calificador encargado de evaluar el Proyecto de Tesis titulado **Deteccion de mutaciones que confieren resistencia a drogas antirretrovirales en poblaciones minoritarias de VIH-1 en plasma**” realizada en el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la salud (ICGES) por Claudia Gonzalez certifican de manera satisfactoria la calidad de este trabajo de investigacion

6 FEB 2018

Dr Juan Miguel Pascale
Presidente del Jurado y Asesor de Tesis

Dr Carlos Ramos
Miembro del Jurado

Dr Tomas Diez
Miembro del Jurado

Claudia Gonzalez

DEDICATORIA

A Dios
Lucas 1 37

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme cumplir una de mis metas profesionales

A mis padres hermanas cuñado y abuelos por siempre estar pendiente y brindarme su apoyo incondicional

A mis amigos que son mi familia escogida, porque siempre me motivaron

Alexander siempre brindaste tu sincero consejo para mejorar este proyecto
A mis amigas Alma, Jessica y Griselda por siempre estar pendientes

A mis compañeros del departamento de Genómica y Proteómica que siempre cuando necesite de su ayuda en alguna situación me brindaron la mano amiga sin titubear

Al ICGES por permitirme realizar el estudio

INDICE GENERAL

PORTADA	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE GENERAL	V
INDICE CUADROS	VIII
INDICE FIGURAS	X
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	1
SUMMARY	2
I INTRODUCCION	3
II FUNDAMENTO TEORICO	5
A Generalidades	5
B Clasificacion	5
C Estructura	6

D	Ciclo de Vida de VIH	7
E	Progresion de la enfermedad	8
F	Terapia Antirretroviral	9
	1 Modo de Accion	10
G	Resistencia a las drogas	11
H	Clasificacion de Mutaciones	14
	1 Las mutaciones mayores de INTI	15
	<i>a) M184V</i>	<i>15</i>
	2 Mutaciones timidina analogica (TAM)	16
	3 Las mutaciones NNRTI Mayor	16
	<i>a) K103N</i>	<i>17</i>
	<i>b) Y181C</i>	<i>18</i>
	4 Las mutaciones Menores INTR	19
	5 Las mutaciones en otras clases	19
I	Prevalencia de mutaciones	20
J	Poblaciones Minoritarias	22
K	PCR en Tiempo Real	23
	1 Factores influyen en el Ct	23
L	ARMS qPCR	25
	1 Pruebas para laboratorios point of care o atencion primaria	
III	ASPECTO METODOLOGICO	27

A	OBJETIVOS	27
	1	
	Objetivo General	
	2	
	Objetivos Especificos	
B	Tipo de Investigacion	28
C	Diseño	28
D	Universo	28
E	Tamaño de la Muestra	28
F	Criterios de Inclusion	28
G	Criterios de Exclusion	29
H	Justificacion	29
I	Impacto	29
IV	METODOLOGIA	30
	A	
	Extraccion de ARN	30
	B	
	Protocolo de RT PCR	31
	C	
	Protocolo de ARMS	31
	D	
	Analisis del ARMS qPCR	33
V	RESULTADOS	34
VI	DISCUSION	42
VII	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
VIII	ANEXOS	47
IX	BIBLIOGRAFIA	55

INDICE DE CUADROS

Cuadro I

Identificación de los cambios en codones de interés para los INNTR 16

Cuadro II

Comparación de las metodologías conocidas para detección de mutaciones 24

Cuadro III

Cebadores y sondas utilizados en la prueba de ARMS qPCR 31

Cuadro IV

Cantidades para servir cada componente de la reacción de ARMS qPCR 32

Cuadro V

Promedios de valores de CT obtenidos para cada uno de los codones 37

Cuadro VI

Determinación de Sensibilidad y Especificidad M184V en pacientes naive 38

Cuadro VII

Determinacion de Sensibilidad y Especificidad M184V en pacientes con falla inmunologica	38
--	-----------

Cuadro VIII

Determinacion de Sensibilidad y Especificidad T215Y en pacientes naive	39
---	-----------

Cuadro IX

Determinacion de Sensibilidad y Especificidad T215Y en pacientes con falla inmunologica	39
--	-----------

Cuadro X

Determinacion de Sensibilidad y Especificidad K103N en pacientes naive	40
---	-----------

Cuadro XII

Determinacion de Sensibilidad y Especificidad K103N en pacientes con falla inmunologica	41
--	-----------

Cuadro XIII

Sensibilidad y Especificidad obtenidas de ARMS qPCR en pacientes naïve y falla inmunologica	41
--	-----------

INDICE DE FIGURAS

Figura 1

Modelo del Iceberg 22

Figura 2

Ejemplo de un ciclo umbral en una prueba de tiempo real 24

Figura 3

Distribucion de los valores de CT en el codon 184 para el juego de cebadores para la cepa salvaje 35

Figura 4

Distribucion de los valores de CT en el codon 184 para el juego de cebadores de la cepa mutada 35

Figura 5

Distribucion de los valores de CT en el codon 215 para el juego de cebadores para la cepa salvaje 36

Figura 6

Distribucion de los valores de CT en el codon 215 para el juego de cebadores de la cepa mutada 36

Figura 7

**Distribucion de los valores de CT en el codon 103 para para el juego de cebadores
para la cepa salvaje 36**

Figura 8

**Distribucion de los valores de CT en el codon 103 para el juego de
cebadores de la cepa mutada 37**

ABREVIATURAS

ABC Abacavir

ADN ácido desoxirribonucleico

ARN ácido Ribonucleico

ARMS amplification refractory mutation system PCR assay

ARV antiretrovirales

AS PCR PCR alelo específica

cDNA ADN complementario

EFV Efavirenz

gp41 glicoproteína 41

INTR inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa reversa

INNTR inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa reversa

LTR largas terminaciones terminales

MINSA Ministerio de Salud

NVP nevirapina

TDF Tenofovir

OMS Organización Mundial de la Salud

PCR reacción en cadena de la polimerasa

SIDA síndrome de inmunodeficiencia adquirida

TARGA/ HAART tratamiento antirretroviral de gran actividad

TR transcriptasa reversa

VIH virus de inmunodeficiencia humana

ZDV/AZT zidovudina

RESUMEN

GONZALEZ (2017) DETECCION DE LAS MUTACIONES T215Y, M184V Y K103N DEL VIH-1 EN SUJETOS SIN TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL Y EN SUJETOS CON FALLA INMUNOLOGICA POR MEDIO DE ARMS qPCR (2011-2015)

El Virus de Inmunodeficiencia Humano continua siendo el causante de una de las epidemias presentes en America Central. En este estudio se analizo el uso de la tecnica de ARMS para la deteccion de mutaciones puntuales (M184V, T215Y y K103N) en la region pol de VIH 1. Este metodo es rapido y costo efectivo comparado con la metodologia de secuenciacion. Se analizaron 164 muestras de plasma las cuales se les realizo prueba de carga viral de VIH 1 y genotipaje de VIH 1 usando el sistema Viroseq v2.5. Los resultados obtenidos por ARMS qPCR se compararon con los de secuenciacion. El ARN fue extraido utilizando el kit QIamp viral para ARN. Para el desarrollo del ARMS qPCR se utilizaron los cebadores descritos por Nanfack et al con algunas modificaciones y sondas especificas que permitieron la deteccion en el equipo de PCR en tiempo real (Rotorgene Q). Para los codones 184, 215 y 103 se analizaron 121 sujetos antes del inicio del tratamiento y se obtuvo una concordancia del 98.3%, 95.8% y 96.7% respectivamente. La prueba tambien se realizo para los mismos cebadores en 43 sujetos que presentaron falla inmunologica y la concordancia fue de 83%, 95% and 80% respectivamente. La prueba de ARMS qPCR demostro ser capaz de detectar con aceptable concordancia, las principales mutaciones observadas en resistencia transmitida: M184V, T215Y y K103N en pacientes pre tratados. Esta metodologia podria ser una opcion para la deteccion de resistencia al VIH en paciente antes de recibir tratamiento especialmente en paises con ingresos medios y bajos donde la secuenciacion no esta disponible. Ademias esta tecnica le ofrece al medico el contar con un resultado en menor tiempo y asi elegir el mejor esquema inicial de tratamiento para un paciente determinado es decir en forma personalizada.

SUMMARY

GONZALEZ (2016) DETECTION OF HIV-1 MUTATION T215Y, M184V AND K103N ON ARV DRUG NAIVE SUBJECTS AND ARV EXPERIENCED SUBJECTS USING ARMS qPCR (2011-2015)

The Human Immunodeficiency Virus epidemic is still ongoing in Central American countries. Here we analyzed the use of the ARMS technique for detecting known point mutations (M184V, T215Y and K103N) in the HIV polymerase gene. This method is suitable for rapid and cost-effective compared to a sequencing method. Plasma samples (n=164) were analyzed for viral load and genotyping test Viroseq v2.5. The ARMS qPCR results were compared with the genotyping test. RNA was extracted using QIamp viral RNA mini kit. For the optimization of ARMS PCR, we used the primers described by Nanfack et al. with some modifications and probes that allowed detection of each mutation using Rotorgene Q. For codons 184, 215 and 103, 121 naive subjects were studied. We obtained a concordance of 98.3%, 95.8% and 96.7% respectively. Also, the test was proven with subjects with treatment failure. Samples (n=43) were analyzed for each codon. The concordance of the test was 83%, 95% and 80% respectively. ARMS qPCR had acceptable concordance in detecting M184V, T215Y and K103N, better than ARV drug naive subjects. A fact that is important because they are the most common mutations observed in patients with transmitted drug resistance. This could be an option as a novel method for the detection of the patient status before the beginning of the treatment in countries with low and medium resources where sequencing methods are not available. This method could minimize the time to obtain the result and help the physician to select the best initial treatment scheme for a specific patient.

INTRODUCCION

El virus de Inmunodeficiencia Humano (VIH) es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En el 2014, alrededor de 36.9 millones de personas vivían con el VIH y alrededor de 2 millones de personas se infectaron ese año y 1.2 millones de personas murieron de enfermedades relacionadas con el SIDA. Para junio de 2015, habían 15.8 millones de personas bajo tratamiento antirretroviral (ARV) en el mundo (ONUSIDA, 2015).

La resistencia a medicamentos antirretrovirales es causada por la compleja mezcla de poblaciones genéticas presentes. Solamente la secuencia dominante viral será capaz de ser detectada por metodologías como la secuenciación (Brun, Vézinet et al., 2004; Grant et al., 2003; Halvas et al., 2006). Sin embargo, la población presente en menos del 20% reconocida como población minoritaria, solo es determinada con metodologías como la reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo y otros ensayos para detección de mutaciones puntuales como la secuenciación clonal, pirosecuenciación o secuenciación de segunda generación (NGS) (Heneme, 2010). La PCR alelo específica es una metodología conveniente y menos laboriosa que las previamente mencionadas, logrando ser entre 10 a 65 veces más sensible que la metodología tradicional de genotipaje y poder distinguir poblaciones menores del 1% (Guo, 2010).

El tratamiento de los pacientes esta basado en utilizar la combinacion de inhibidores no nucleosidicos de la transcriptasa inversa (INNTR) e inhibidores nucleosidicos de la transcriptasa inversa (INTR) Los inhibidores no nucleosidicos tienen una barrera genetica baja de resistencia solo la presencia de una mutacion como lo es la K103N es capaz de conferir resistencia al medicamento en el paciente En el estudio HALVAS se evidencia que las mutaciones no determinadas por secuenciacion (presentes en menos del 20%) son comunes en pacientes que han sido previamente expuestos a medicamentos y contribuyen al desarrollo de falla inmunologica (Heneine 2010)

Las quasiespecies constituyen parte la poblacion genetica del virus en el paciente y pueden contener mutaciones que confieran resistencia y convertirse en la poblacion dominante provocando falla La deteccion de estas poblaciones juega un rol importante en el estudio del desarrollo de resistencia Las poblaciones minoritarias aumentan el riesgo de falla virologica al estar relacionada con una mutacion de resistencia y a la vez un aumento de la carga viral del VIH La poca adherencia tambien aumenta esta probabilidad de falla si las mutaciones estan presentes en niveles bajos al estar libre de la presion selectiva, estas poblaciones con resistencia al medicamento aumentan (Guo 2010)

I FUNDAMENTO TEORICO

A Generalidades

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Barre Sinoussi et al 1983 Gallo et al 1984) El VIH era desconocido hace 33 años hoy se estima que 39 millones de personas han muerto por causa del VIH y alrededor de 78 millones de personas han sido infectadas En Panamá, el primer caso se detectó en 1984 (Nuñez et al 2010) Según el informe del Programa Conjunto de Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) en el 2015 se estimaban alrededor de 17 101 (0 69 prevalencia) personas viviendo con VIH

B Clasificación

El VIH pertenece a la familia Retroviridae subfamilia Orthoretrovirinae y género Lentivirus Hasta la fecha dos especies de VIH han sido identificadas el VIH tipo 1 (VIH 1) y VIH tipo 2 (VIH 2) Ambos virus comparten 50% de similitud y tienen un origen zoonótico común con el virus de inmunodeficiencia de los simios (SIV) (Knipe et al 2007) El VIH 1 está más estrechamente relacionada con el SIV que se encuentra en los chimpances comunes (*Pan*

troglydytes troglydytes) (Gao et al 1999 Keele et al 2006) El VIH 2 esta mas estrechamente relacionado con el SIV que infecta a monos mangabey (*Cercocebus atys*) (Chen et al 1996) El VIH 1 se clasifica en cuatro grupos que incluyen M N O y P Sin embargo la mayoría de los virus entran en el grupo principal (M) que se divide en nueve clados (A B C D F G H J y K) cinco sub subtipos (A1 3 y F1 2) y mas de 40 formas recombinantes circulantes

C Estructura de VIH

El virion es en forma icosaedrica con un diametro de 120 nm (Gentile et al 1994 Nermut et al 1993) El VIH esta envuelto por una bicapa lipidica que presenta glicoproteinas (gp) que sobresalen de la membrana La gp120 es un trimero que se une de forma no covalente a trimeros de gp41 (Allan et al 1985 Chan et al 1997 Kwong et al 1998 Veronense et al 1985) La bicapa lipidica encierra un nucleo proteico conico alargado que posee dos hebras de ARN de cadena simple de sentido positivo y las enzimas transcriptasa inversa (RT) la integrasa y una proteasa (Gelderblom et al 1987 Knipe et al 2007) El genoma posee 9 700 nucleotidos y codifica para nueve genes que generan 15 proteinas Los tres mayores genes estructurales incluyen *GAG POL* y *ENV* Los seis genes accesorios mas pequeños incluyen *VIF VPR, TAT REV VPU* y *NEF* Las largas repeticiones terminales (LTR) localizadas en cada extremo contienen promotores que estan relacionados con el proceso de transcripcion (Kuiken et al 2009)

El gen *POL* codifica enzimas que intervienen en la reproduccion y la infeccion (proteasa, la transcriptasa inversa y la integrasa) El gen *ENV* codifica las proteinas de la membrana que permiten la union viral y fusion a celulas diana Las proteinas reguladoras y accesorias juegan un papel en la transcripcion viral y tienen importantes factores de virulencia Las largas repeticiones

terminales (LTR) flanquean el genoma viral y están involucradas en la transcripción (Knipe et al 2007) El gen *GAG* codifica las proteínas de la matriz (subunidad p17) de la capsida (subunidad p24) nucleocapsida (subunidad p7) y proteínas estructurales p6 (Kuiken et al 2009)

D Ciclo de vida del VIH

VIH 1 infecta las células que expresan el receptor CD4 incluyendo linfocitos T CD4+ macrófagos y células dendríticas. La gp120 sufre cambios estructurales cuando se une al CD4 lo que permite el virus se adhiera a los co receptores CCR5 o CXCR4. Una vez que el virus se une a la célula diana, la región del péptido de fusión de gp41 penetra en la célula (Wyatt y Sodroski 1998). Luego de la fusión de membranas el virus sufre desensvoladura, permitiendo a las partículas virales introducirse en el citoplasma de la célula hospedera (Lehmann Che y Saib 2004). La transcriptasa inversa (RT) es también la ARN polimerasa viral dependiente de ADN y retro transcribe el ARN en ADN. La enzima también tiene la función de RNasa H que se requiere para la degradación del ARN viral permitiendo la formación de cDNA (Sarafianos et al 2009). Antes de la integración se forma un complejo que consiste en cDNA viral, la integrasa, la proteasa vpr y la transcriptasa inversa. El complejo de pre integración se traslada al núcleo y la integrasa media la integración del ADN viral en una región transcripcional del genoma del hospedero (Lehmann Che y Saib 2004).

En la célula hospedera la activación proviral se produce debido a la activación de genes reguladores de la transcripción que se unen al LTR (Kuiken et al 2009). Como consecuencia se producen transcritos virales cortos durante la transcripción basal que forman la horquilla a los que se une Tat. Junto a esta estructura se reclutan otros factores que permiten la producción de la

longitud completa de los transcritos de VIH 1 (Kuiken et al 2009 Zheng et al 2005) Los transcritos se empalman en fragmentos de 2 kb o 4.4 kb Estos pueden salir del nucleo con facilidad mientras que el otro requiere de Rev (Zheng et al 2005) Los fragmentos mas cortos se traducen en el citoplasma y Tat, Rev y Nef se producen Rev se une a RRE y lanza los transcritos mayores al citoplasma (Pollard y Malim 1998) Durante el ensamblaje del virion las hebras de ARN y poliproteinas de *GAG* se ensamblan en la membrana de la celula hospedera P6 media interacciones permitiendo la maduracion de los viriones (Bieniasz, 2009 Klein et al 2007)

E Progresion de la enfermedad

La transmision del VIH se puede producir a traves de la exposicion sexual con una pareja infectada, por la exposicion con sangre infectada o sus derivados por exposicion intra utero durante el parto o traves de la lactancia materna (CDC 2005) La infeccion por VIH ocurre comunmente a traves de las superficies mucosas y en estos puntos de entrada, las celulas dendriticas interactuan con el virus y facilitan la infeccion de linfocitos T CD4+ (Geijtenbeek y van Kooyk 2003) La carga viral es alta en la infeccion inicial pero disminuye a medida que los linfocitos T citotoxicos controlan al virus (Musey et al 1997) A medida que la enfermedad progresa, el virus continua infectando linfocitos T CD4+ por lo que la carga viral aumenta y los linfocitos T CD4+ disminuyen En consecuencia, el recuento de linfocitos T CD4+ y la carga viral estan fuertemente correlacionados con la del desarrollo de SIDA (Goedert et al 1987 Mellors et al 1995b Phillips et al 1991)

Los pacientes en la etapa de SIDA se caracterizan por un recuento de linfocitos T CD4+ menor de 200 celulas/mm³ y por la presencia de infecciones oportunistas graves asociadas con el VIH (OMS 2007)

F Terapia antirretroviral

La terapia antirretroviral (ARV) suprime la replicación viral permitiendo así la reconstitución parcial del sistema inmune y por lo tanto retarda la progresión a SIDA (Connick et al 2000 Tochikura et al 1989) Sin embargo como el VIH se integra en el material celular de las células inmunitarias del hospedero los pacientes deben permanecer en terapia ARV indefinidamente (Weller y Williams 2001) Hasta junio de 2015 mundialmente había 15.8 millones de personas en tratamiento. Al mismo tiempo pese a que las nuevas infecciones por el VIH han disminuido todavía hay un número inaceptablemente alto de nuevas infecciones por el VIH y de muertes relacionadas con el SIDA cada año (ONUSIDA 2015)

Cada clase de medicamento ARV interfiere con una etapa diferente en el ciclo de vida viral. La terapia antirretroviral combinada (HAART/TARGA) se aprovecha de esta condición ya que consta de al menos tres fármacos distintos pertenecientes al menos a dos de la misma clasificación (Clavel et al 2004). En las guías de Panamá, el esquema indicado incluye dos inhibidores de la transcriptasa inversa y un inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa inversa como primer esquema. Como segundo esquema se prescriben dos medicamentos de transcriptasa inversa nucleosídicos con un inhibidor de proteasa, usualmente Lopinavir/Ritonavir.

El tratamiento antirretroviral en los últimos años ha aumentado la esperanza de vida de muchos pacientes viviendo con VIH alrededor del mundo logrando disminuir las posibilidades de progresión a SIDA. La mejora de la respuesta inmune es posible una vez se disminuye la replicación del virus. La falla del primer régimen de tratamiento se puede deber a diversas

razones como la desnutricion lo que a su vez disminuye la absorcion de los medicamentos Otras razones son la carencia de recursos economicos la adherencia a los medicamentos ARV el desabastecimiento de medicamentos que tambien dificulta el cumplimiento del mismo e incrementa la posibilidad de resistencia transmitida (Rath et al 2013)

1 **Modo de accion**

Los medicamentos inhibidores nucleosidos de la transcriptasa reversa (INTR) son analogos de bases nitrogenadas estructuralmente similares a los nucleosidos naturales pero los residuos de ribosa carecen del grupo hidroxilo en la posicion 3 Estos nucleosidos son fosforilados por quinasas celulares y compiten con los dNTPs para su incorporacion en el ADNc transcrito Como el analogo del nucleosido carece del grupo hidroxilo 3 la siguiente base no puede formar el enlace fosfodiester 3 5 y la sintesis de ADN se ve interrumpida (Menendez Arias 2008)

Los Inhibidores no nucleosidos de la transcriptasa reversa (INNTR) son un conjunto diverso de pequeños compuestos hidrofobicos (<600 Da) Los INNTR no siguen el mismo mecanismo que los INTR estos previenen la actividad al reposicionar el residuo catalitico del aspartato localizado en la proteina p66 de la transcriptasa reversa Los inhibidores de la proteasa se unen y disminuyen la actividad de la proteasa, la escision de las poliproteinas virales GAG y GAG POL por lo que no permiten la maduracion viral El inhibidor de la entrada, Enfuvirtida, se une a la gp41 y evita que la proteina realice cambios conformacionales necesarios para la fusion (Lalezari et al 2009) El inhibidor de la integrasa, Raltegravir se une al dominio catalitico de la integrasa, previniendo la insercion del ADNc viral en el genoma huesped (Sichtig et al 2009) El inhibidor CCR5

Maravi Roc se une y bloquea los co receptores CCR5 en las células inmunes (Saber y Schapiro 2008)

G Resistencia a las Drogas

Más de 10 millones de personas de países de medio y bajos recursos económicos están recibiendo el tratamiento (ONUSIDA 2013 Montaner et al 2014) siendo una combinación de uno o más INTR y un INNTR. Cuando el tratamiento es efectivo al disminuir la replicación viral se reduce la transmisión y se revierten enfermedades por inmunodeficiencia. Al haber un aumento dramático del uso de los ARV teóricamente se debe disminuir la incidencia de la infección en el adulto la transmisión vertical y la mortalidad asociada.

A pesar de que la resistencia en pacientes que están bajo tratamiento ha disminuido en años recientes ninguna región ha mostrado una disminución en la resistencia en pacientes sin tratamiento o naïve. Esta situación indica que a pesar de contar con un buen control de la epidemia debido al uso correcto de los antirretrovirales la transmisión de resistencia se perpetúa debido a que estos han sido infectados con una cepa resistente (Wertheim et al 2017). Esta es la razón por la cual un diagnóstico temprano y seguimiento de la carga viral es importante con un tratamiento eficiente. El conocimiento de la magnitud y dirección de la resistencia transmitida es importante en la salud pública mediante estos resultados se puede indicar el desarrollo de nuevos medicamentos guías de tratamiento indicación de pruebas de monitoreo o identificación de nuevas terapias que no estén dirigidas a INNRTI (Snedecor et al 2014).

Se ha determinado que al seguir el tratamiento de primera línea, alrededor del 10% 30% de los pacientes presentará falla inmunológica. En la actualidad se presenta un aumento de resistencia a medicamentos adquirida luego de la exposición mientras que para sujetos que aún no han iniciado tratamiento el porcentaje de resistencia ha aumentado más del 5% (Rhee 2015).

Al encontrarse este nivel de aumento de las resistencias previa al tratamiento se hace imperativo revisar las guías de tratamiento ARV. Actualmente cuando hay falla al primer esquema, se cambia un INNTR por un inhibidor de la proteasa, haciendo el tratamiento más costoso y menos tolerable para el paciente. La determinación de mutaciones que pueden conferirle resistencia a un medicamento al paciente por medio de una prueba conveniente contribuye con una terapia personalizada. El realizar una prueba de genotipaje de VIH previa al tratamiento es una recomendación de las guías internacionales. Una prueba ARMS específica para determinar las mutaciones más prevalentes en el país es una alternativa costo/efectiva para estudiar a todos los pacientes previo a su tratamiento.

La terapia con medicamentos ARV reduce drásticamente la replicación viral y como consecuencia del generalizado uso de la terapia antirretroviral combinada (≥ 3 medicamentos de ≥ 2 clases) la mortalidad y la morbilidad relacionada con el SIDA han disminuido (OMS / SIDA 2008). Sin embargo el desarrollo de mutaciones de resistencia a fármacos o la infección con un virus resistente puede llevar al fracaso del tratamiento (Erice et al 1993, Kozal et al 1993).

Las mutaciones de resistencia a drogas pueden desarrollarse en respuesta al tratamiento con cada fármaco ARV disponible (Johnson et al 2009). En el tipo salvaje los virus son susceptibles a las drogas, la prevención de la evolución de resistencia a los medicamentos y por extensión el éxito de la terapia con medicamentos ARV depende de la adherencia a largo plazo. Dependiendo de la droga se requiere el cumplimiento de > 60 al 95% para lograr la supresión virológica y prevenir el desarrollo de resistencia a las drogas (Gardner et al 2009). Algunos estudios sugieren que de 10 personas nuevas infectadas una es infectada por una cepa resistente (Detsika et al 2007).

La exposicion al farmaco inadecuada puede dar lugar a la expansion de las cuasi especies resistentes a las drogas. Estas subpoblaciones pueden aumentar rapidamente fuera de la competencia del virus de tipo salvaje que conduce al fracaso del tratamiento (Gardner et al 2009). La poblacion del VIH 1 dentro de un individuo es geneticamente heterogenea como resultado de tres factores: (1) el VIH 1 exhibe una tasa de replicacion de hasta 10^{10} viriones por dia (Perelson et al 1996, Piatak Jr et al 1993); (2) la TR tiene una alta tasa de error de copia (Roberts et al 1988); sustituciones, adiciones y supresiones se introducen con una velocidad de hasta 5 errores / ciclo de replicacion (Preston et al 1988); (3) la recombinacion que puede ocurrir si un individuo esta infectado con dos cepas diferentes del VIH (Burke 1997, Zhuang et al 2002).

Estos factores conducen a la evolucion de las muy diversas subpoblaciones de cuasi especies en un paciente infectado. Si alguna de las mutaciones aleatorias que se desarrollan proporciona una ventaja selectiva en presencia de medicamentos ARV, entonces esa cuasi especie mutante competiria con los virus menos aptos (Simon et al 2006). Sin embargo, la resistencia a los medicamentos no siempre se desarrolla en vivo en respuesta a la presion de la terapia con medicamentos ARV. Aunque es relativamente poco comun, la transmision del VIH resistente a drogas se produce y es una creciente preocupacion en todo el mundo (Bennett et al 2008, Erice et al 1993). Del mismo modo, los diferentes subtipos de VIH 1 no responden por igual a cada medicamento ARV debido a los polimorfismos (Palmer et al 1998). En contraste con el fracaso del tratamiento debido a la resistencia a los medicamentos, la toxicidad de ciertas drogas a menudo limita el exito de la terapia y esto puede depender de la genetica del huesped (Tozzi 2010).

H Clasificación de Mutaciones

Las mutaciones del VIH 1 se clasifican como primarias / principales secundarias / menores o compensatorias. Cuando están presentes solo las mutaciones primarias estas son capaces de inducir altos niveles de resistencia a drogas. Las mutaciones secundarias son menos potentes ya que su sola presencia reduce marginalmente la sensibilidad a los medicamentos. En consecuencia, estas mutaciones se encuentran casi exclusivamente con otras principales mutaciones primarias. Las mutaciones pueden dar lugar a la disminución de la actividad lo que se compensa por el desarrollo de mutaciones compensatorias que restauran la actividad viral (Shafer 2002). La barrera genética de un fármaco o clase de fármacos es una medida que determina la facilidad con la que la resistencia se desarrolla durante el tratamiento. Uno o dos polimorfismos de un nucleótido (SNPs) conducen a alto nivel de resistencia a las drogas con una barrera genética baja mientras que se requieren diversos SNPs para desarrollar resistencia a las drogas con una alta barrera genética. En general los inhibidores de RT tienen una baja barrera genética, mientras que los IP tienen una alta barrera genética (Luber 2005). Las mutaciones minoritarias presentes en pacientes naïve pueden estar presentes debido a una o dos fuentes: la resistencia transmitida o mutaciones de novo debido a la actividad viral del VIH.

1 Las mutaciones principales de INTR

Los INTR asemejan nucleosidos naturales y se incorporan en las cadenas de ADN. La incorporación del INTR impide la elongación continuada debido a que las bases modificadas carecen del grupo hidroxilo 3' (Menendez Arias 2008). Existen dos tipos de mutaciones

inducidas a los INTR las que resultan en una mayor discriminación de los análogos de base nitrogenada y las que resultan en la eliminación de la cadena de terminación inducida por los INRT. La discriminación mejorada retrasa la incorporación de 3TC, ABC, ddI, FTC y la replicación viral continua (Shafer y Schapiro 2008). Los medicamentos análogos de la timidina (ZDV y d4T) son afectados por el segundo tipo de mutación y se denominan mutaciones de análogo de la timidina (TAM) (Clavel y Hance 2004). La transcriptasa reversa mutada tiene una conformación alterada lo que permite la unión de ATP. El ATP unido rompe el enlace fosfodiéster entre la cadena de ADN y el análogo de base lo que permite continúe el alargamiento (Boyer et al 2001).

a) M184V

Una mutación de los INTR común es el cambio de metionina (M) a valina (V) en el codón 184 (M184V) del VIH 1 produciendo un alto nivel de resistencia (>500 veces). La mutación se produce como resultado de un SNP en esta posición (ATG → GTG) la cual provoca la sustitución de la metionina en el sitio catalítico de la TR. Cuando se usa 3TC en monoterapia, se desarrolla M184V en una semana lo que resulta en la resistencia de alto nivel (Clavel y Hance 2004). M184V también se traduce en bajo nivel de resistencia a ddI y ABC pero una mayor susceptibilidad a ZDV, d4T y TDF (Shafer y Schapiro 2008).

En la ausencia de la presión selectiva, las poblaciones que tengan virus con la mutación M184V reversionarán rápidamente a cepa salvaje y no puede ser detectada por secuenciación debido a su replicación de bajo impacto (Toni et al 2009). La presencia de la mutación M184V al inicio sin tratamiento aumenta la resistencia en un 2-10% en corto tiempo en comparación con sujetos sin la mutación (Vignoles et al 2009).

2 Mutaciones provocadas por analogos de timidina (TAM)

El nivel de resistencia a ZDV d4T y otro INTR es proporcional al numero de TAMs presentes. Las mutaciones de resistencia se dividen en dos categorias de tipo I y tipo II. El patron de tipo I incluyen M41L, L210W y T215Y y el tipo II incluyen D67N, K70R, T215F y K219Q / E (Shafer y Schapiro 2008). K70R y T215Y / F confieren resistencia moderada a ZDV y d4T (Garcia Lerma 2005). La presencia de dos mutaciones D67N, K70R y T215Y o M41L / T215Y son necesarios para presentar alta resistencia (Menendez Arias 2008). M41L, D67N, L210W y K219Q / E son mutaciones secundarias y solo confieren resistencia cuando se asocia con K70R y T215Y / F (Garcia Lerma, 2005).

3 Las mutaciones INNTR Principales

Los inhibidores no nucleosidicos de la transcriptasa reversa (INNTR) son pequeños compuestos que inhiben especificamente la transcriptasa reversa del VIH 1. Los INNTR se unen a un sitio hidrofobo adyacente al sitio activo de la transcriptasa reversa de VIH induciendo un cambio conformacional y asi disminuye la actividad de la misma (Martins et al 2008). Actualmente se conocen 30 diferentes clases de INNTR. En la siguiente tabla se muestran los cambios de residuos de aminoacidos y las mutaciones de nucleotidos que producen resistencia en los INNTR (Cuadro I).

Codon	Cepa salvaje (wild type)	Secuencia Mutada	Cambio de residuo de aminoacido
K103N	AAA/G	AAC/T	Lisina(K) → Asparagina (N) o Serina (S)
V106M	GTA/G	ATG	Valina (V) → Metionina (M)
Y181C	TAT	TGT	Tirosina (Y) → Cisteina (C)
G190A	GGG/A/C/T	GCA	Glicina (G) → Alanina (A)
P225H	CCC/T	CAC	Prolina (P) → Histidina (H)

Cuadro I Identificacion de los cambios en codones de interes para los INNTR

a) K103N

La mutacion se produce en el codon 103 cuando se da un cambio del codon AAA o AAG por AAC o AAT y se producen asparagina (N) o serina (S) respectivamente en vez de lisina (K) Este cambio en el residuo de aminoacido produce un alto nivel de resistencia a NVP y EFV (Guo 2010) Se forma un puente de hidrogeno con las mutaciones 103N y 188Y que estabiliza el sitio catalitico y reduce drasticamente el enlace de los INNTR, confiriendo amplia resistencia a estos medicamentos (Harrigan et al 2005 Ren y Stammer 2008) Los INNTR tienen una baja barrera genetica debido a que la actividad RNasa H se disminuye por lo tanto la K103N puede persistir años en niveles bajos en la ausencia de droga (Martinez Picado y Martinez 2008)

Polilli demostro la presencia y persistencia de la mutacion K103N una vez ha sido expuesto al medicamento a pesar que este fuera en un corto periodo de tiempo (Polilli et al 2009) Por esta razon la busqueda de esta mutacion toda vez que el paciente haya sido expuesto al medicamento aunque sea por corto tiempo es imperativo Lo ideal es usar metodologias como lo es la PCR alelo especifica, que permiten su deteccion en corto tiempo La primera generacion de INNTR tiene una barrera genetica baja y es por esto que la K103N es capaz de conferir resistencia luego de la presion selectiva El efavirenz (EFV) y la nevirapina (NVP) tienen una vida en el plasma mas largo comparado con los INTR Para el efavirenz es de 14 5 167 6 horas comparada con la de AZT la cual es de 1 2 horas y con 3TC que es de 8 horas La interrupcion del medicamento ya sea programada o no favorece la aparicion de esta mutacion

Por lo general la poblacion resistente a NVP alberga K103N en el plasma y es capaz de disminuir por debajo del limite de deteccion (50 copias de ARN VIH 1 / mL) por genotipo estandar despues de seis meses de interrumpir el tratamiento (Johnson Li et al 2005 Loubser Balfe et al 2006 Palmer Boltz et al 2006 Palmer Boltz et al 2006 Metzner Giulieri et al 2009 Saladini Vicente et al 2009 Toni Asahchop et al 2009 Wind Rotolo Durand et al 2009)

Una mujer embarazada a la cual se le administro nevirapina durante el parto para prevenir la trasmision al recién nacido puede generar la aparicion de K103N que persistira como una poblacion minoritaria por lo menos 5 años despues de la exposicion asi sucede con pacientes que han tenido una falla inmunologica Estas variantes menores persisten por un periodo maximo de cinco años en el plasma despues de retirada de la presion de drogas (Flys Donnell et al 2007) Las mismas son tambien encontradas en los depositos latentes de celulas T CD4 en reposo (Siliciano Kajdas et al 2003 Bailey Sedaghat et al 2006 Briones de Vicente et al 2006 Wind Rotolo Durand et al 2009) A diferencia del genotipaje los ensayos de mutaciones especificas basadas en la PCR en tiempo real han demostrado poder detectar y cuantificar variantes menores resistentes a los medicamentos como la K103N y otras mutaciones asociadas a la resistencia cuando esta presente en una muestra de paciente con frecuencias menores del 20% incluso menores del 0.1% (Metzner Bonhoeffer et al 2003 Halvas Aldrovandi et al 2006 Palmer Boltz et al 2006 Palmer Boltz et al 2006 Johnson Li et al 2007 Paredes Marconi et al 2007 Balduin Oette et al 2009)

b) Y181C

El cambio la tirosina (Y) a cisteina (C) en la posicion 181 da como resultado la perdida de un anillo aromatico y la interaccion entre el residuo de aminoacido y las drogas ARV Como hay

mayor interacción entre la enzima y NVP comparado con EFV la mutación Y181C se asocia en mayor grado con resistencia a NVP y en grado moderado con resistencia a EFV (Ren y Stammer 2008)

4 Las mutaciones secundarias INTR

La mayoría (95%) de las mutaciones secundarias se producen con la presencia de mutaciones principales. Estas incluyen a las K20R, T39A, K43E / Q / N, E44D / A, T69N / S / E / G / inserción, V75M / A, V118I, G196E, K122E, E203K / D y H208Y (Delaugerre et al 2001, Gonzales et al 2003, Mellors et al 1995a, Saracino et al 2006, Shafer y Schapiro 2008, Svicher et al 2006)

5 Las mutaciones en otras clases de medicamentos

En total más de 80 mutaciones en más de 40 sitios confieren resistencia a uno o más de los inhibidores de la proteasa (IP). Similar a las mutaciones de los INNTR, las mutaciones a IP conducen a una disminución de la afinidad del inhibidor de proteasa en el sitio diana (Otake y Freire 2005). Las mutaciones I47V / A y V82A / F / T / S confieren alto nivel de resistencia a los IP (Johnson et al 2009). El inhibidor de la integrasa, raltegravir, pierde actividad cuando una de las mutaciones (Q148H / K / R, N155H y Y143R / H / C) está presente en asociación con una o más mutaciones menores (L74M, E138A / K y G140S).

La combinación de mutaciones de resistencia más común que se observa en pacientes usando raltegravir es la Q148H con la G140S (Johnson et al 2009). Las mutaciones alteran el sitio de

union del inhibidor de la integrasa, disminuyendo la afinidad de la enzima por el farmaco (Shafer y Schapiro 2008)

El inhibidor CCR5 maraviroc se une a los complejos de CCR5 en células hospederas y previene la union del VIH con estos co receptores Sin embargo los virus resistentes son capaces de unirse a estos sitios en las células diana (Latinovic et al 2009) El inhibidor de la fusion enfuvirtida, se une a los residuos de aminoacidos 36 45 de la gp41 del VIH Múltiples mutaciones en esta zona no solo resultan en una fuerte resistencia a enfuvirtida, sino que tambien disminuyen la actividad viral (Greenberg y Chamaca, 2004) Las N126K N137K y S138A son mutaciones compensatorias a menudo se presentan en virus resistentes a Enfuvirtida (Shafer y Schapiro 2008)

I Prevalencia de mutaciones

Si bien hay muchas mutaciones que confieren resistencia a los medicamentos solo una minoria se encuentra en mas del 10% de los pacientes Estas mutaciones prevalentes en las proteínas del VIH p66 / p51 incluyen M41L D67N K70R L90M K103N Y181C M184V T215Y y L210W (Cheung et al 2004 Rhee et al 2004) Comparada con la poblacion salvaje las poblaciones con mutaciones generalmente tienen una barrera genetica menor por ende al no estar presente la presion selectiva del medicamento en esta poblacion disminuye hasta el punto donde ya no es detectada por secuenciacion convencional Por otro lado estas poblaciones pueden aumentar debido a la diversidad causada por la alta replicacion y los errores de la enzima transcriptasa reversa Se estima que alrededor de cinco mutaciones pueden aparecer por cada ciclo de replicacion La produccion diaria de mas de 10 100 millones de ciclos de replicacion da como resultado la rapida generacion de una poblacion que presenta mutaciones en el genoma viral Por

esta alta diversidad la resistencia es posible observarla aun sin la exposicion a la droga (L1 & Kuritzkes 2013)

El uso de antirretrovirales para inhibir la replicacion de VIH 1 esta comprometido por la aparicion espontanea de variantes virales resistentes a los medicamentos o de variantes resistentes transmitidas. Un estimado del 5-15% de los pacientes sin tratamiento de Estados Unidos y Europa presenta una variante resistente (Cozzi Lepri et al 2015). En Panama, la prevalencia de resistencia transmitida es alrededor de 12-2% (Avila Rios 2016)

La aparicion de mutaciones que causan resistencia es una de las razones para que se presente falla virológica, por lo que las guías de tratamiento recomiendan el uso de pruebas para determinar la presencia de mutaciones antes del inicio del tratamiento de primera línea y así adaptarlo al paciente (Nicot et al 2012). Algunos estudios han demostrado una asociación particularmente alta con los INNTR donde el uso de los mismos aumenta al doble el riesgo del fallo del tratamiento (L1 et al 2011)

Mientras que la relevancia clínica de las poblaciones minoritarias se mantiene en debate la evidencia es que la presencia de estas mutaciones tiene un efecto subsecuente a pesar de tener altos niveles de adherencia a los anti retrovirales. Estudios previos sugieren que variantes resistentes a los INNTR presentes en más del 2% de la población total están altamente ligadas a falla virológica al iniciar tratamientos que nevirapina o efavirenz. Por otro lado otros autores han encontrado que en muy baja frecuencia estos no tienen ningún efecto. Diversos estudios discrepan sobre la importancia de las mismas. La poca adherencia es un factor ligado directamente a la presencia de las mutaciones minoritarias ya que la presencia de una dosis sub óptima de los medicamentos como consecuencia produce consecuentemente una supresión incompleta de la replicación lo que al final produciría las mutaciones (L1 & Kuritzkes 2013)

J Poblaciones Minoritarias

El modelo de Iceberg ilustrado por Van Laethem et al refleja las quasiespecies o minoritarias de VIH 1 (Figura 1) solo unas cuantas de las mutaciones en las quasiespecies son detectadas en un porcentaje mayor del 20% representadas en el modelo por encima del nivel del agua, mientras que las minoritarias estan por debajo de ese nivel y no son capaces de ser detectadas En un paciente al cual al cual se le realizo un genotipaje que presento mutaciones el tratamiento personalizado (basado en estas mutaciones) no le funciono y se procedio a realizar pruebas de secuenciacion de segunda generacion las cuales por ser mas sensibles fueron capaces de determinar mutaciones minoritarias que le confirieron resistencia al virus (Pingen et al 2011)

Una alternativa seria la determinacion de mutaciones de Resistencia por PCR en tiempo real a los pacientes por medio del que van a iniciar el tratamiento ya que el genotipaje convencional no es capaz de determinar las poblaciones minoritarias En un estudio de casos y controles Johnson et al 2009 demostro que 7 de los 95 pacientes que presentaron falla virológica tenían poblaciones minoritarias no detectadas previamente por genotipaje

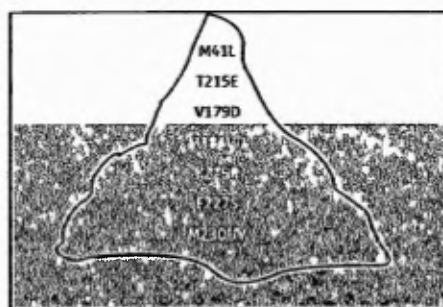


Figura 1 Modelo del Iceberg Refleja la capacidad de solo detectar poblaciones por encima del nivel del agua es decir poblaciones en mayor del 20% mientras las minoritarias por debajo del agua no son detectadas

K PCR en Tiempo Real

La técnica de PCR en tiempo real es una modificación de la convencional PCR creada en 1992 por Higuchi y colaboradores (Higuchi et al 1992 1993) La PCR en tiempo real permite la cuantificación de ácidos nucleicos a pesar de que el material de inicio este en baja concentración Esto se logra mediante el monitoreo de la amplificación de una secuencia diana utilizando una sonda específica La rapidez con la cual la secuencia de interés alcanza el umbral se relaciona con la cantidad de material inicial Las aplicaciones de la PCR en tiempo real son diversas por ejemplo cuantificación de carga viral en pacientes PCR alelo específica y otros

1 Factores que influyen en el valor de Ct

El Ct (ciclo umbral) es la intersección entre la curva de amplificación y el umbral es el ciclo en el cual la fluorescencia es mayor que la fluorescencia basal es decir donde inicia la amplificación (Figura 2) El Ct es una medida relativa de la concentración de la secuencia de interés en la reacción de PCR Diversos factores afectan el valor absoluto de Ct además de la concentración Artefactos de la mezcla de reacción o el instrumento pueden variar la fluorescencia importante para el cálculo del Ct Es por esta razón que las reacciones de PCR en condiciones diferentes o usando diferentes reactivos no pueden compararse Algunas variantes de la PCR en tiempo real para la detección de mutaciones como es la amplificación refractory mutation system PCR assay

(ASPCR), permite amplificar ambas secuencias la salvaje y la mutada y al momento del análisis los Ct de las muestras. (Metzner et al., 2003)

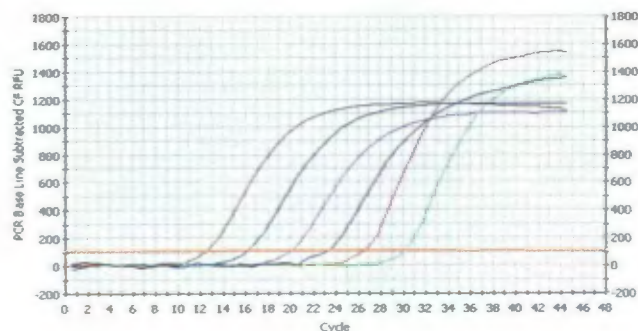


Figura 2. Ejemplo de un ciclo umbral en una prueba de tiempo real.

Ensayo	Ventajas	Desventajas	Uso clínico
Genotipificación convencional	Más información del virus	Difícil la interpretación No identifica las variantes minoritarias	Sí
Fenotipo	Resultados intuitivos Evade la interpretación compleja e patrones	Costoso Tiempo de respuesta extenso Uso limitado para países fuera de Europa o Estados Unidos Menor sensibilidad	No
PCR-Alelo Específica	Alta sensibilidad	Detecta solo algunas de las mutaciones de interés	No
Pirosecuenciación	Alta sensibilidad Evalúa la región de interés	Costoso Necesita un bioinformático para su análisis	Sí
OLA	Moderadamente sensible Equipos de fácil acceso No requiere de personal especializado	Solo detecta algunas de las mutaciones No es cuantitativo	No

Cuadro II Comparación de las metodologías conocidas para detección de mutaciones. Descripto

L ARMS qPCR

La prueba de ARMS (amplification refractory mutation system PCR assay) qPCR es una PCR alelo específica (AS PCR) modificada con detección en tiempo real. La metodología ARMS se basa en la eficiencia de la extensión entre el cebador y la posición del codón si está mutada o no por medio de una PCR tiempo final (Nanfack et al 2015). Al realizar una modificación a la ARMS convirtiéndola en PCR en tiempo real se utilizan sondas para aumentar la sensibilidad y siendo capaz de detectar mutaciones en poblaciones presentes en menos del 20 % en el paciente. Las sondas utilizadas fueron publicadas por Metzner et al y Bergoth et al para la detección específica de las mutaciones K103N y M184V específicamente. Comparada con las metodologías convencionales el ARMS es sensible más rápido y específico para la detección de mutaciones. Por lo tanto el desarrollo de una metodología capaz de detectar las mutaciones M184V T215Y y K103N aun en forma minoritaria, mejora grandemente el manejo clínico de los pacientes.

1 Pruebas para laboratorios de atención primaria

Una prueba de laboratorio para la detección de mutaciones point of care o de atención primaria es útil en donde los recursos capacidad e infraestructura es limitada para realizar una prueba de genotipaje por secuenciación. Este tipo de prueba sería útil en conjunto con pruebas de carga viral de VIH para laboratorios POC o de atención primaria. Este tipo de prueba de determinación de mutaciones para laboratorios usualmente utiliza la metodología alelo específica para la detección de resistencia (Rhee et al 2015).

En países con mayores ingresos se les realiza prueba de resistencia a los pacientes al inicio del tratamiento y luego se repite si estos presentan falla inmunológica. En países de menores

recursos estas pruebas solo se realizan en laboratorios especiales La posibilidad de una prueba en laboratorios de atencion primaria para un mejor acceso a los pacientes y los medicos Se tomarian decisiones terapeuticas basadas en informacion sobre la presencia de mutaciones que pudieran conferir resistencia en pacientes Tres grupos de pacientes serian beneficiados con esta estrategia los que inician tratamiento los que presentan falla inmunologica y los pacientes que presentan carga viral de HIV detectable con alguno de los esquemas (Rhee 2015)

II ASPECTOS METODOLOGICOS

A HIPOTESIS

La presencia de poblaciones minoritarias del VIH que no son capaces de ser identificadas por técnicas convencionales de secuenciación podría ser detectadas mediante la PCR en tiempo real

B OBJETIVOS

1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las mutaciones principales en poblaciones minoritarias de VIH por PCR en tiempo real

2 OBJETIVO ESPECIFICOS

Optimizar una metodología de PCR en tiempo real para la detección de mutaciones en poblaciones minoritarias en plasma de sujetos VIH positivos

Identificación de las poblaciones minoritarias presentes en pacientes que no hayan iniciado tratamiento

C Tipo de Investigacion Observacional

D Diseño Retrospectivo Descriptivo

E Universo

Muestras de plasmas de sujetos VIH positivos que acudieron entre el 2011 y el 2015 para la realizacion de pruebas de monitoreo de carga viral de VIH 1 en el departamento de Genomica y Proteomica del Instituto Gorgas

F Tamaño de la Muestra

Se seleccionaron 164 muestras que cumplieran con los criterios de inclusion

Se excluyeron muestras del 2012 y 2013 por carecer de la cantidad necesaria de plasma

G Criterios de Inclusion

- Muestras a los cuales se les realizo previamente la prueba de genotipificacion de VIH 1 por la metodologia Viroseq v2 5
- Muestras con una carga viral mayor de 2 000 copias /mL
- Muestras con al menos 1 mL de plasma congelado a 80°C

H Criterios de Exclusion

- Muestras con una cantidad de plasma menor a 1 mL
- Muestras sin resultado previos de genotipaje o carga viral deVIH 1

I Justificacion

En la actualidad la tecnica para determinar el genotipaje de VIH de los pacientes es capaz de detectar las poblaciones virales que esten presentes por arriba del 20 30% Esta metodologia tiene un alto costo y es laboriosa, por lo cual es necesaria una alternativa para la deteccion de estas mutaciones La alternativa propuesta no solo presenta un mejor costo beneficio sino que tambien es capaz de detectar poblaciones minoritarias las cuales se escapan en la metodologia convencional utilizada actualmente

J Impacto

El contar con una metodologia capaz de detectar poblaciones minoritarias en pacientes previo al inicio de tratamiento asi como en sujetos en falla inmunologica mejorando la calidad de vida de los pacientes con VIH y tambien apoyaria al sistema de salud a brindar una terapia personalizada y mas efectiva

III METODOLOGIA

A Extraccion de ARN

La extraccion de las muestras se realizo utilizando el QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen Inc Valencia CA) Se sirvio 500 µl de los plasmas luego fueron centrifugadas a 14 000 x g por 1h a 4°C y se descarto 360 µl del sobrenadante de las muestras y se continuo siguiendo las instrucciones del fabricante

B Protocolo de RT PCR

Se completo la hoja de trabajo de amplificacion con los codigos de las muestras que se procesaron y se realizaron los calculos de la cantidad de reactivo necesario para cada reaccion (Anexo 2) Se atemperan los reactivos de 2x Master Mix Invitrogen (P/N 51099) RT Platinum Invitrogen (P/N 53146) MgSO₄ Invitrogen (P/N 51100) y cebador RT3798 en una hielera y se atemperan los extraidos Se prepararon las mezclas y luego se agrego 12 ul de extraido Se colocan los microtubos de 0.2 ml en el termociclador para una incubacion inicial a 65°C por 1 minuto la cual permite la hebra de RNA este relajada Luego se retiraron los microtubos de termociclador y agregaron 38 µl de la mezcla en cada uno a temperatura ambiente Una vez finalizo se colocaron los tubos en el termociclador nuevamente y se continuo con el programa de amplificacion Continuo la RT a 50°C por 60 minutos despues un ciclo de 85°C por 2 minutos seguido por un ciclado de 50 veces 94°C por 10 segundos 50°C por 30 segundos

y 72°C por 90 segundos Por ultimo la extension a 72°C por 6 minutos Al culminar la amplificacion se colocaron los microtubos a -20 °C

C Protocolo de ARMS q PCR

Se atemperaron los reactivos de amplificacion de ARMS q PCR detallados a continuacion 10X Buffer PCR Gold Applied Biosystems (P/N L0026 01) MgCl₂ Applied Biosystems (P/N 58002032 01) dNTPs Applied Biosystems (P/N 362273) y Gold Taq Applied Biosystems (P/N 411021) Luego se atemperaron los juegos de cebadores por mutacion (Cuadro III

	ID	Secuencia	Tamaño
INTRs	M184V_WT_R	5 TAAATCAGATCCTACATACAAATCATACAT 3	328 pb
	M184V_MUT_R	5 TAAGTCAGATCCTACATATAAAATCATCCTC 3	
	T215Y/F_WT_R	5 TTCTTTCTGATGTTTCTTATCTGGTGTGGT 3	421 pb
	T215Y/F_MUT_R	5 TTCTTTCTGATGTTTCTTATCTGGTGGGWA 3	
	Primer F	5 AGCCGGGATGGATGGCCCA 3	
INNT Rs	K103N_WT_R	5 TCTCCCACATCCAGTACTGTTACTGATGTT 3	300 pb
	K103N_MUT_R	5 TCTCCCACATCCAGTACTGTTACTGAGTTR 3	
		Primer F	5 AGCCGGGATGGATGGCCCA 3
Sonda	M184T215sonda	MGB 5 (6FAM) 3 DARKQUENCHER CCAGCAATATTCCAAAGCAGCA	
	K103Nsonda	5 (6HEX)TTTTGGGAGGTTCAATTAGGAATACCACATCC(BHQ)3	

Cuadro III Cebadores y sondas utilizados en la prueba de ARMS qPCR

Se rotularon 6 tubos de 0.5 ml para cada una de las mezclas como 184WI 184MUT 215WI 215MUT 103WI 103MUT Se sirvieron los reactivos para cada uno de las mezclas segun los calculos de la hoja de trabajo (Cuadro IV)

	Componente	Ix (µl)
Reactivos	H ₂ O	9.5
	10X Buffer	2.5
	MgCl ₂	6.0
	dNTPs	2.0
	Gold Taq	1.0
	Cebador F	0.5
	Cebador R	0.5
	Sonda	0.15
	Muestra	2.5

Cuadro IV Cantidades a servir por cada componte de la reaccion de qPCR

Se sirvieron 22.5 µl de mezcla en cada uno de los tubos de 0.2 ml. Luego se sirvieron 2.5 µl de la muestra a cada uno de los 6 microtubos correspondiente de cada mutacion y se colocaron en el termociclador (rotor gene) y se programo la corrida. El programa en el equipo es 2 min a 94°C seguido por 35 ciclos a 94° C por 5 minutos 55°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos. Se adquiere en la extension y los canales son el verde y amarillo. El programa tiene una duracion 110 minutos. Los resultados se colocaron en la hoja de trabajo en el cual se comparo con los resultados de secuenciacion de las muestras. Los resultados de la secuenciacion por la metodologia de Viroseq fueron amablemente provistos por un proyecto del Instituto Conmemorativo Gorgas.

D Analisis del ARMS qPCR

Al final el procesamiento de las muestras se obtuvo un valor de Ct. La población que se encuentra en mayor proporción será la que se beneficiará e iniciará la amplificación en menor tiempo, es decir, el valor de Ct será menor para el mismo. Los valores obtenidos se tabularon y se analizaron por medio del programa R. El programa R permitió el análisis de concordancia entre los resultados obtenidos por la prueba de ARMS qPCR y los resultados de genotipificación de VIH 1. Para los análisis de sensibilidad y especificidad se utilizó la herramienta MED calculator.

IV RESULTADOS

Se analizaron muestras de plasma (n=164) clasificadas en pacientes naive (n= 121) valor promedio de carga viral de VIH 1 de 316 810 copias/ml con una desviacion de 620 704 copias/ml Se analizaron sujetos en falla inmunologica (n= 43) el valor promedio de carga viral de VIH 1 fue de 125 468 copias/ml con una desviacion de 322 438 copias/ml

Los valores mínimos y máximos fueron de 2 740 copias/mL y 1 922 822 para pacientes con falla inmunologica Los valores mínimos y máximos de los pacientes naive fueron de 1 640 copias/mL y 10 000 000 copias/mL El valor elevado de desviacion de ambos grupos produjo a que se encontraron diversos resultados de carga viral de VIH 1 mayores de un millon de copias/mL

En cuanto a los datos demograficos de los pacientes evaluados 124 sujetos fueron hombres (76%) y 40 fueron mujeres (24%) las edades comprendian entre 18 y 74 años con un promedio de edad de 34 años y una desviacion de 11 9 años

Para el analisis de la prueba ARMS qPCR se utilizaron dos juegos de cebadores un juego esta dirigido a detectar la cepa salvaje (en el codon de interes) en las muestras de los participantes el otro juego de cebadores esta dirigido a detectar la presencia de cambios (mutaciones) en las muestras de los participantes Por cada juego de cebadores se obtiene un valor de Ct

En las muestras de pacientes sin tratamiento que no presentan la mutacion se espera que el valor Ct para el juego de cebador para el virus salvaje inicie o sea menor comparado con el valor de Ct

obtenido al utilizar el juego de cebadores para virus mutados. Por otro lado, las muestras que tienen presente una mutación en los codones de estudio se espera lo contrario, es decir que el valor de Ct sea menor con el juego de cebadores para virus mutados.

El análisis de valores de Ct se realizó en dos grupos pacientes sin tratamiento (naïve) y pacientes en falla inmunológica (FT). Los Ct de las muestras se analizaron para cada uno de los codones en estudio 184, 215 y 103. La distribución de los valores de Ct obtenidos para cada uno de los codones se encuentra a continuación (Figuras 2-7):

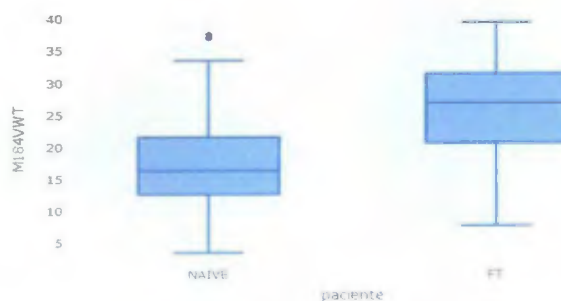


Figura 2. Distribución de los valores de CT en el codón 184 para el juego de cebadores salvaje. Pacientes naïve a la izquierda y pacientes en falla inmunológica a la derecha.

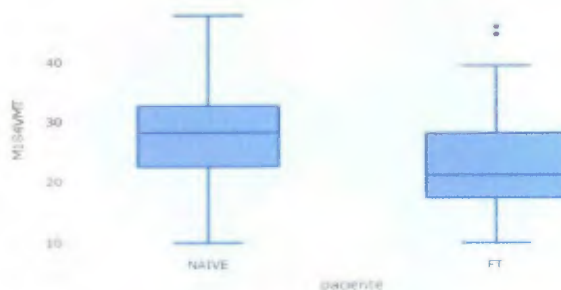


Figura 3. Distribución de los valores de CT en el codón 184 para el juego de cebadores mutado. Pacientes naïve a la izquierda y pacientes en falla inmunológica a la derecha.

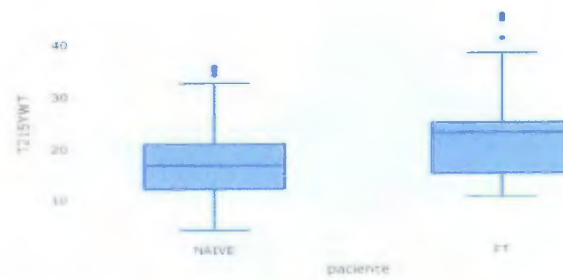


Figura 4. Distribución de los valores de CT en el codón 215 para el juego de cebadores salvaje. Pacientes naïve a la izquierda y pacientes en falla inmunológica a la derecha.

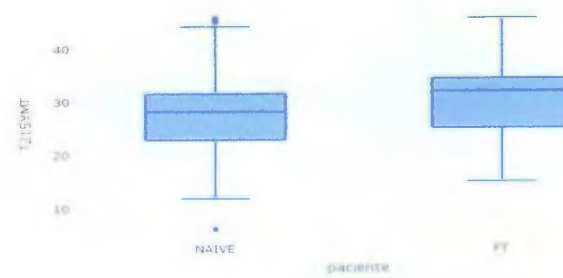


Figura 5. Distribución de los valores de CT en el codón 215 para el juego de cebadores mutado. Pacientes naïve a la izquierda y pacientes en falla inmunológica a la derecha.

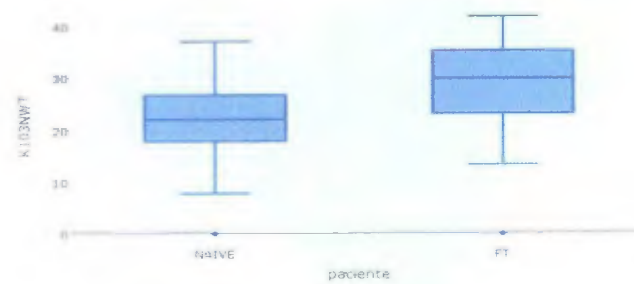


Figura 6. Distribución de los valores de CT en el codón 103 para el juego de cebadores salvaje. Pacientes naïve a la izquierda y pacientes en falla inmunológica a la derecha.

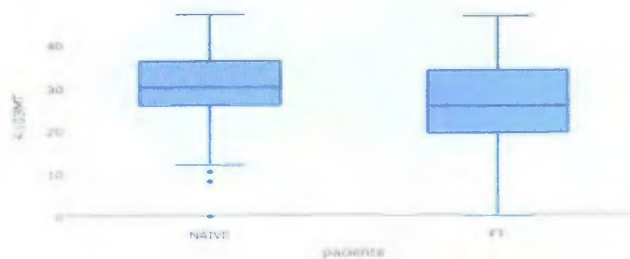


Figura 7. Distribución de los valores de Ct en el codón 103 para el juego de cebadores mutado. Pacientes naïve a la izquierda y pacientes en falla inmunológica de lado derecho

CODON	Promedio del valor de Ct			
	Naïve		Falla inmunológica	
	Salvaje	Mutado	Salvaje	Mutado
184	12.36-21.26	22.16-32.30	20.35-31.17	17.10-27.77
215	11.93-20.66	22.64-31.38	14.88-24.69	24.91-36.27
103	17.84-26.74	25.91-36.22	23.15-35.29	19.35-33.94

Cuadro V. Promedios de los valores de Ct obtenidos para cada uno de los codones en estudio.

La técnica de ARMS qPCR tiene como objetivo la detección de las mutaciones M184V, K103N y T215Y. Para la evaluación de la metodología se comparan los resultados con la metodología de referencia, secuenciación. La sensibilidad y especificidad de la prueba se calcularon en dos poblaciones las de pacientes sin tratamiento y pacientes con falla inmunológica.

La sensibilidad es la proporción de verdaderos positivos identificados por la prueba del total de enfermos y la especificidad de la prueba es la proporción de verdaderos negativos identificados por la prueba del total de sanos. En este caso sería la identificación de la mutación en pacientes con falla inmunológica y la identificación de la cepa salvaje en pacientes sin tratamiento (Ver cuadros VI X1)

Secuenciación		
Positivo	Falso	ARMS qPCR
119	1	Positivo/salvaje
1	0	Falso/mutado

Cuadro VI Determinación de Sensibilidad y Especificidad M184V en pacientes naive

Los resultados obtenidos por la prueba en la mutación M184V para pacientes naive indican una sensibilidad de 99.17% y especificidad de 100%. De los 121 pacientes 119 pacientes fueron identificados como cepa salvaje por ambas metodologías. La metodología de ARMS qPCR en 21 muestras amplificó solamente para el juego de cebadores salvaje lo cual sugiere que estas muestras la población presente era solo de cepa salvaje de VIH 1. A la muestra que se le identificó la mutación M184V los Ct para ambos juegos de cebadores fue cercano. A esta muestra se le detectaron mutaciones en diversos codones por secuenciación lo cual sugiere una alta variabilidad genética de la misma.

Secuenciación		
Positivo	Falso	ARMS qPCR
22	4	Positivo
3	13	Falso

Cuadro VII Determinación de Sensibilidad y Especificidad M184V en pacientes con falla inmunológica

Los resultados obtenidos por ARMS qPCR M184V para pacientes con falla inmunológica indican una sensibilidad de 88 0 % y especificidad de 76 47 % La metodología de secuenciación detectó 25 muestras con la mutación y 17 cepas no mutadas La PCR en tiempo real fue capaz de detectar 22/25 de las mismas 4 de ellas solo amplificaron para el juego de cebadores mutado es decir la población predominante era la cepa mutada Uno de los resultados difería entre las metodologías la muestra fue identificada como salvaje por secuenciación y mutado por la prueba de ARMS qPCR Se realizó una segunda secuenciación meses después al del análisis y generándose el mismo resultado que el obtenido con el ARMS qPCR M184V

Secuenciación		
Positivo	Falso	ARMS qPCR
115	0	Positivo/salvaje
5	1	Falso/mutado

Cuadro VIII Determinación de Sensibilidad y Especificidad T215Y en pacientes naive

Los resultados obtenidos por la prueba para el codón 215 para pacientes naive indican una sensibilidad de 95 83 % y especificidad de 100 % La metodología de secuenciación detectó 120 muestras con cepa salvaje El PCR en tiempo real detectó 115 muestras como cepa salvaje de las cuales 25 muestras solamente amplificaron para el juego de cebadores salvaje

Secuenciación		
Positivo	Falso	ARMS qPCR
35	0	Positivo
2	6	Falso

Cuadro IX Determinación de Sensibilidad y Especificidad T215Y en pacientes con falla inmunológica

Los resultados obtenidos por la prueba para el estudio del codon 215 en pacientes con falla inmunologica indican una sensibilidad de 94.54% y especificidad de 100%. La metodologia de secuenciacion detecto 37 muestras con la mutacion. La PCR en tiempo real fue capaz de detectar 35 de las mismas. 5 de ellas solo amplificaron para el juego de cebadores mutado, es decir, la poblacion predominante en esas muestras era la cepa mutada.

Secuenciacion		ARMS qPCR
Positivo	Falso	
108	2	Positivo/salvaje
2	9	Falso/mutado

Cuadro X Determinacion de Sensibilidad y Especificidad K103N en pacientes naive

Los resultados obtenidos por la prueba para el codon 103 en pacientes naive indican una sensibilidad de 98.18% y especificidad de 81.82%. La metodologia de secuenciacion detecto 110 muestras con cepa salvaje y 11 muestras presentaban la mutacion K103N. La PCR en tiempo real determino 108 muestras como cepa salvaje, de las cuales 69 solo amplificaron para el juego de cebadores para cepas salvajes. El ARMS qPCR identifico 9 de las 11 muestras mutadas, y 2/9 solo amplificaron el juego de cebadores mutado.

Secuenciacion		ARMS qPCR
Positivo	Falso	
15	5	Positivo
1	21	Falso

Cuadro XII Determinacion de Sensibilidad y Especificidad K103N en pacientes con falla inmunologica

Los resultados obtenidos ARMS qPCR 103 para pacientes con falla inmunologica indican una sensibilidad de 93 75 % y especificidad de 80 77 % La metodologia de secuenciacion detecto 16 muestras con la mutacion y 26 como cepa salvaje La metodologia de ARMS qPCR detecto la presencia de 15 muestras con la mutacion y 21 con la cepa salvaje La amplificacion de 8/15 fue solamente para el par de juego de cebadores mutado mientras que para las muestras sin mutacion se detectaron 11/21 para el juego de cebadores salvaje Uno de los resultados diferia entre las metodologias la muestra fue identificada como salvaje por secuenciacion y mutado por la prueba de AMRS qPCR Se realizo una segunda secuenciacion meses despues al del analisis y generandose el mismo resultado que el obtenido con el ARMS qPCR K103N

Mutacion	Paciente Sin Tratamiento		Paciente con Falla inmunologica	
	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
M184V	99 17	100	88 0	76 47
T215Y	95 83	100	94 59	100
K103N	98 18	88 18	93 75	80 77

Cuadro XIII Sensibilidad y Especificidad obtenidas para la prueba ARMS qPCR en pacientes naive y falla inmunologica

V DISCUSION

Contar con una metodología alternativa para la detección de mutaciones de interés clínico es importante debido a que en la región de Latinoamérica se considera que el nivel de resistencia transmitida de VIH 1 es moderado (5% 12%) En el estudio multinacional por Avila Rios et al se reporto en Panama 12 2% de resistencia transmitida en sujetos viviendo con VIH El aumento en la resistencia transmitida es debido a la implementación del acceso universal al tratamiento antirretroviral seguido por problemas como desabastecimientos y poca adherencia Se considera que si la prevalencia > 5 % de cepas resistentes es recomendable el realizar pruebas de genotipaje de VIH a los pacientes (Battegay 2007)

Una prueba para determinar las mutaciones con mayor prevalencia en centros de atención primaria disminuye los retos y atrasos asociados con el solo contar con una prueba centralizada para determinar la presencia de resistencia en los pacientes y permitir un mejor manejo del seguimiento del tratamiento (Jonhson et al 2005 Wensing et al 2005) Se podrian clasificar tres tipos de candidatos para utilizar esta prueba los pacientes los cuales no han iniciado su tratamiento y pacientes con falla virológica al primer esquema y embarazadas

Las metodologías como la carga viral en atención primaria y prueba de resistencia en centros de atención indicarán si los pacientes deben cambiar el esquema o necesitan de un mejor soporte en la adherencia de los medicamentos (Rhee et al 2015) Una prueba de PCR en tiempo real en lugares de atención primaria puede ser utilizada en pacientes que cambian de clínica y no cuentan con la historia de antirretrovirales pacientes embarazadas que presenten un virus con resistencia, y se les pueda indicar el mejor régimen y de esta forma evitar la transmisión vertical

En las muestras analizadas de pacientes sin tratamiento (naive) se observaron valores de CT bajos utilizando el juego de cebador salvaje para cada uno de los codones lo cual indica que un gran porcentaje de las muestras no tienen presente ninguna de las mutaciones en estudio. El virus al no tener una alta variabilidad en la región de interés los cebadores salvajes son capaces de anidarse y detectar la población salvaje. Comparando el rango de valores de CT de cada una de los codones en estudio se puede observar que los valores para el codón 103 son ligeramente más elevados resultados que concuerdan con el estudio de Mendoza et al 2016 los cuales informaron que en Panamá la mutación más frecuente en pacientes sin tratamiento es K103N. El determinar la presencia de mutaciones previo al tratamiento indicaría el cambio a otros esquemas como por ejemplo el uso de inhibidores de integrasa (Clutter et al 2016).

Los valores de CT en pacientes con falla inmunológica fueron elevados a los del grupo de pacientes naive. Esto puede ser resultado a que la variabilidad genética de la cepa en pacientes con tratamiento es mayor y afecta la anidación de los cebadores en la secuencia de estudio. En comparación los valores de CT en pacientes con falla inmunológica son de menor valor en el juego de cebadores para detectar mutación en los codones 184 y 103 (17 27 19 33) respectivamente mientras que para el codón 215 el de menor valor (14 24) es para el juego de cebadores que detectan la cepa salvaje. En resumen se favorece la amplificación de la cepa mutada para los codones 103 y 184 a diferencia de la región del codón 215. En los pacientes con falla virológica se encuentra una mayor diversidad viral resultado de los errores generados en la replicación del virus por la transcriptasa reversa (Porter 2015).

Estos resultados están de acuerdo con el reporte donde se determinó que en Panamá el 77 % de los pacientes que están bajo tratamiento con EFV y presenta la mutación K103N (69%) (Mendoza et al 2016). Para las mutaciones asociadas al INTR, la más común es M184V (76%) comparada con la presencia de T215Y/F (26%) (Rhee et al 2015). Los codones de estudio 184 y 103

tendrían alta variabilidad al estar bajo la presión selectiva de los medicamentos. Se ha encontrado falla inmunológica en la primera línea de tratamiento en más del 30% en pacientes por año y que esta asociada con la adquisición del virus con las mutaciones K103N y M184V (Barth et al 2010, McMahon et al 2013, Wertheim et al 2017).

La sensibilidad de la prueba AMRS qPCR obtenida en pacientes sin tratamiento es mayor, es decir, la capacidad para determinar la presencia de una mutación en esta población es más alta. Los valores de sensibilidad para AMRS qPCR M184V, AMRS qPCR T215Y y AMRS qPCR K103N son mayores del 98%. Por lo tanto, la metodología podría implementarse en un laboratorio de primera atención para pacientes recién diagnosticados y así tener un tratamiento personalizado.

En cuanto a los resultados obtenidos para pacientes con falla inmunológica, debido al número de muestras menor de 50 y los valores de sensibilidad y especificidad inferior a los requeridos para una prueba diagnóstica, recomendamos el uso de ARMS qPCR solo para el manejo de pacientes antes de iniciar el tratamiento. La información obtenida por medio de la prueba en pacientes al inicio sería útil para el infectólogo para el sistema de salud en la compra de los medicamentos adecuados y para mejorar la calidad de vida del paciente. Por otro lado, en pacientes que presentan falla inmunológica, la obtención de más información del virus que circula en estos será de mayor utilidad para el infectólogo (Luz et al 2015).

En un paciente que presentó falla inmunológica, los resultados obtenidos por ambos métodos (ARMS qPCR y secuenciación) fueron distintos. La prueba de tiempo real detectó la presencia de la mutación M184V y K103N. La prueba de secuenciación realizada en la fecha no detectó estas mutaciones en el plasma, se repitió una prueba de genotipaje de VIH 1 (secuenciación) y detectándose ambas mutaciones. Esto pudo deberse a que la prueba de secuenciación solo es

capaz de detectar poblaciones mayores del 20% (Paredes 2010) Este caso puede evidenciar la capacidad del ARMS qPCR de detectar poblaciones menores del 20% La PCR alelo especifica es una metodologia conveniente y menos laboriosa logrando ser entre 10 a 65 veces mas sensible que la metodologia tradicional de genotipaje puede distinguir poblaciones que estan en menos del 1% (Guo et al 2010) Se ha determinado que la presencia de variantes impacta la eficiencia de los medicamentos incluyendo la nevirapina y efavirenz, independientemente de la carga viral que presentan los pacientes (Cozzi et al 2015)

La informacion brindada por una prueba de resistencia previa al inicio de tratamiento se evitaria el prescribir una dosis no eficiente y provocar la adquisicion de una resistencia temprana y ademas las consecuencias a largo plazo de un incompleto control de la viremia (Mulder et al 2013) Por medio de secuenciacion de segunda generacion varios estudios han observado la relacion entre la presencia de mutaciones minoritarias en pacientes que inician el primer esquema el periodo de tiempo en que se produce (John et al 2016)

El uso de una prueba para la deteccion de mutaciones en establecimientos de atencion primaria seria util para el monitoreo y prevencion de la resistencia a medicamentos El uso de la informacion para el diseño del tratamiento mejora significativamente el pronostico (Baxter et al 2000 Cohen et al 2002 Tural et al 2002) Esto tendria como resultado un mayor tiempo de efectividad y sostenibilidad de los medicamentos y el alcance de la meta para el año 2020 de 90% diagnosticados 90% bajo tratamiento y 90% con pruebas de monitoreo

VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La metodología ARMS qPCR permite la detección de mutaciones en codones de relevancia en pacientes que no han iniciado tratamiento antirretroviral. A los pacientes que presentan falla inmunológica se les recomienda otro tipo de metodología que permita obtener más información debido a la variabilidad genética del virus.
- La prueba es útil para el manejo de pacientes naïve y ayuda al infectólogo a elegir el tratamiento más adecuado. La metodología es sencilla y rápida ya que en un periodo de 8 horas se puede obtener el resultado. Una recomendación sería la preparación de estándares que permitan la cuantificación de las poblaciones presentes en el paciente y desarrollar una PCR múltiple para la detección de las tres mutaciones.
- Las características de la ARMS qPCR permiten la detección de mutaciones en pacientes que no han iniciado su tratamiento. Los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba fueron aceptables.
- Al utilizar estos tipos de estrategias que evitan tratamientos subóptimos para el paciente se mejora la calidad de vida de las personas viviendo con VIH, el cual es uno de los objetivos primordiales del sistema de salud.

VII. ANEXOS



Metodología de ARMS qPCR

Hoja de trabajo de amplificación																																								
		GP		GP		GP		GP		OBS																														
1		6		11		16																																		
2		7		12		17																																		
3		8		13		18																																		
4		9		14		19																																		
5		10		15		20																																		
RT PCR					ARMS																																			
DENATURALIZACIÓN			OBSERVACIONES			ARMS	(Nota -25µl)	Rxn	OBSER. ACCIONES																															
RNA ng-5µg	12					H ₂ O	10	90																																
RTPCR MDX (total-50µl)	Rxn					10X PCR buff	2.5	22.5																																
H ₂ O	8.6					MgCl 50mM	6	54																																
ZX Reaction Mix	25					dNTP 12.5 mM	2	18																																
MgSO ₄	.6					P m F 25 µM	0.5	4.5																																
Primer RT3798	Por/Fecha		P m R 25 µM	0.5	4.5	Taq Gold 1000 U/µl	1	9	Por/Fecha																															
Primer JA269			So da 10 µM	0.15	1.35	REACTIVO POR TUBO	2.25	18	Por/Fecha																															
Primer JA272			Nota: Después de 5 min de incubación debe luz en pausa ya se programa termociclador forma manual para servir RT etc.	Prod cto d PCR 1	2.5																																			
RT																																								
REACTIVO POR TUBO																																								
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">MUTACIÓN M184V</th> <th colspan="2">MUTACIÓN T215V</th> <th colspan="2">MUTACIÓN K103N</th> </tr> <tr> <th>Primer</th> <th>103F Panama</th> <th>Primer</th> <th>103F Panama</th> <th>Primer</th> <th>NNRT1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Primer</td> <td>84V W</td> <td>Primer</td> <td>215 W</td> <td>Primer</td> <td>103 W</td> </tr> <tr> <td></td> <td>84V UT</td> <td></td> <td>215 UT</td> <td></td> <td>103 UT</td> </tr> <tr> <td>SONDA</td> <td>84V (F)</td> <td>SONDA</td> <td>84V (F)</td> <td>SONDA</td> <td>103 (HEX)</td> </tr> </tbody> </table>											MUTACIÓN M184V		MUTACIÓN T215V		MUTACIÓN K103N		Primer	103F Panama	Primer	103F Panama	Primer	NNRT1	Primer	84V W	Primer	215 W	Primer	103 W		84V UT		215 UT		103 UT	SONDA	84V (F)	SONDA	84V (F)	SONDA	103 (HEX)
MUTACIÓN M184V		MUTACIÓN T215V		MUTACIÓN K103N																																				
Primer	103F Panama	Primer	103F Panama	Primer	NNRT1																																			
Primer	84V W	Primer	215 W	Primer	103 W																																			
	84V UT		215 UT		103 UT																																			
SONDA	84V (F)	SONDA	84V (F)	SONDA	103 (HEX)																																			

Hoja de trabajo de la prueba ARMS qPCR

Cuadro de valores de CT obtenidos para cada una de las muestras en estudio

N	Secuenciacion		M184V		T215Y		K103N	
	INTRs	INNTRs	Salvaje	Mutado	Salvaje	Mutado	Salvaje	Mutado
1	V118I	Susceptible	23 71	28 1	20 8	0	25 45	0
2	Susceptible	K103N	14 52	24 71	14 11	24 81	0	15 01
3	V118I	Susceptible	10 04	24 21	16 8	0	19 81	0
4	T69N	Susceptible	23 31	0	22 41	27 8	30 56	0
5	Susceptible	K103R	18 17	0	18 03	0	20 09	27 95
6	T215S	Susceptible	29 51	0	35 35	0	30 73	0
7	Susceptible	Susceptible	16 76	29 65	19 89	0	25 28	0
8	Susceptible	Susceptible	19 33	29 46	19 56	28 65	28 22	0
9	Susceptible	Susceptible	24 11	36 13	23 64	30 9	34 46	0
10	Susceptible	Susceptible	24 44	36 29	27 83	0	35 35	38 59
11	Susceptible	Susceptible	22 75	33 23	24 25	28 03	33 18	0
12	Susceptible	Susceptible	26 24	34 56	26 22	36 34	31 99	0
13	Susceptible	Susceptible	17 16	23 45	11 66	23 86	25 44	31 81
14	Susceptible	Susceptible	22 88	31 17	22 65	29 41	30 98	0
15	T215D	K103S G190A	30 06	0	29 08	29 58	36 18	19 07
16	Susceptible	Susceptible	22 13	32 26	23 63	28 55	35 98	31 46
17	Susceptible	Susceptible	26 39	33 09	21 36	0	34 87	0
18	Susceptible	Susceptible	22 14	0	24 85	32 08	25 66	0
19	Susceptible	Susceptible	7 3	23 71	6 4	15 3	19 45	28 91
20	Susceptible	Susceptible	10 88	25 77	11 73	26 37	25 3	0
21	Susceptible	K103N	10 37	20 68	10 3	13 92	32 76	24 82
22	Susceptible	G190A	14 58	24 62	7 56	30 98	26 04	0
23	Susceptible	Susceptible	13 8	21 33	19 35	27 08	21 92	0
24	T215S	V179D	20 45	35 48	30 8	0	26 2	0
25	Susceptible	Susceptible	17 96	29 49	15 99	26 12	18 63	0
26	Susceptible	Susceptible	28 64	38 04	14 69	19 46	20 87	0
27	Susceptible	Susceptible	17 88	31 97	16 35	20 84	23 19	39 82
28	Susceptible	Susceptible	37 37	0	18 17	26 09	26 45	0
29	M41L	Susceptible	18 9	33 06	16 8	33 87	28 43	0
30	Susceptible	Susceptible	16 89	27 84	16 51	31 32	24 69	0
31	Susceptible	Susceptible	9 64	18 62	11 48	19 88	19 31	31 2
32	Susceptible	Susceptible	16 69	17 99	7 7	11 87	16 77	0
33	Susceptible	Susceptible	14 58	23 42	12 8	0	15 54	0
34	M41L T215E	Susceptible	5 88	17 61	17 05	14 82	7 82	0

35	Susceptible	Susceptible	15 85	0	19 49	0	16 79	27 12
36	Susceptible	Susceptible	17 15	0	19 87	28 47	23 52	26 97
37	Susceptible	Susceptible	16 26	23 27	16 03	20 87	23 1	26 88
38	Susceptible	Susceptible	9 18	18 79	32 32	0	17 93	22 92
39	Susceptible	V118I	16 15	25 81	9 59	32 07	15 95	26 51
40	Susceptible	Susceptible	33 21	0	35 54	0	0	0
41	Susceptible	Susceptible	8 94	18 55	9 43	20 52	16 68	0
42	Susceptible	Susceptible	8 82	18 15	12 71	26 72	29 6	0
43	Susceptible	Susceptible	10 72	20 32	10 37	24 79	13 25	26 8
44	Susceptible	K103NS	14 66	28 11	14 61	27 41	23 62	20 17
45	Susceptible	Susceptible	8 88	17 98	14 27	19 74	19 06	0
46	Susceptible	Susceptible	11 44	26 47	16 6	34 59	17 42	0
47	Susceptible	Susceptible	12 97	24 36	12 55	21 24	23 28	0
48	Susceptible	Susceptible	20 53	25 14	28 8	0	17 5	27 66
49	Susceptible	Susceptible	17 94	27 97	21 45	0	22 14	0
50	Susceptible	Susceptible	7 23	12 97	6 31	12 16	10 64	15 24
51	Susceptible	Susceptible	8 03	12 96	9 72	19 4	19 82	25 38
52	Susceptible	Susceptible	14 53	36 14	15 53	28 38	22 05	0
53	Susceptible	Susceptible	13 85	23 78	23 07	37 36	20 3	0
54	Susceptible	K103N	11 39	13 13	7 14	28 14	16 32	8 17
55	E44D	Susceptible	32 8	0	20 23	32 9	24 52	0
56	Susceptible	Susceptible	3 7	9 87	3 9	5 85	14 53	25 34
57	Susceptible	Susceptible	19 66	0	19 78	24 4	34 56	0
58	Susceptible	Susceptible	12 24	31 89	14 22	30 32	31 96	0
59	Susceptible	Susceptible	28	32 43	27 31	36 28	28 6	0
60	Susceptible	Susceptible	8 95	20 5	8	27 09	14 41	25 41
61	Susceptible	Susceptible	23 12	0	33 95	0	18 13	30 31
62	Susceptible	K103N	15 01	26 1	11 18	20 95	26 72	12 1
63	Susceptible	V179D	12 4	27 21	13 83	29 19	25 55	0
64	Susceptible	Susceptible	8 32	9 77	10 35	19 49	12 02	26 04
65	V118I	Susceptible	14 54	30 95	12 56	31 81	16 97	0
66	V118I	Susceptible	15 03	30 85	15 96	37 6	21 46	0
67	Susceptible	Susceptible	14 06	29 29	18 36	29 72	23 88	0
68	Susceptible	Susceptible	13 3	35 6	13 55	23 54	13 09	0
69	Susceptible	Susceptible	15 68	33 7	17 57	0	13 83	35 42
70	V118I	Susceptible	9 69	18 86	13 55	23 5	19 36	27 26
71	Susceptible	Susceptible	12 89	30 64	17 96	0	21 27	0
72	K219N	Y181C	28 26	27 28	19 8	28 36	32 74	0
73	Susceptible	Susceptible	25 99	26 27	34 74	0	26 73	0
74	Susceptible	Susceptible	17 6	26 46	21 39	29 93	21 27	0
75	Susceptible	K103N	18 75	30 46	19 09	0	0	12 59
76	Susceptible	K103N V108I	16 42	18 39	13 67	23 53	27 56	31 54
77	Susceptible	Susceptible	16 08	18 87	25 19	36 8	17 4	27 52
78	Susceptible	K103N P225H	14 04	33	15 72	30 05	20 14	14 08

79	V118I	Susceptible	21 74	27 81	19 8	31 19	13 23	21 62
80	Susceptible	Susceptible	14 33	24 97	11 98	18 77	15 28	29 88
81	Susceptible	Susceptible	16 04	27 61	12 98	24 49	23 29	29 81
82	Susceptible	Susceptible	23 5	31 7	16 96	32 07	14 22	24 58
83	Susceptible	Susceptible	3 21	31 78	18 18	39 25	22 12	25 27
84	Susceptible	Susceptible	16 67	30 66	15 03	23 44	18 73	25 22
85	Susceptible	Susceptible	18 38	0	9 9	14 34	18 38	0
86	Susceptible	Susceptible	19 26	0	11 56	27 35	19 7	0
87	Susceptible	Susceptible	27 02	0	25 15	0	26 29	0
88	Susceptible	Susceptible	36 8	0	23 84	34 64	33 74	0
89	Susceptible	Susceptible	19 82	0	21 85	0	30 78	0
90	Susceptible	Susceptible	12 92	29 11	16 02	28 29	22 95	0
91	Susceptible	Susceptible	16 69	25 03	19 82	31 03	24 18	27 34
92	T215S	Susceptible	21 77	33	14 36	23 93	30 63	0
93	Susceptible	Susceptible	13 78	26 85	22 7	35 86	37	0
94	Susceptible	Susceptible	3 91	10 81	4 22	11 89	9 79	22 29
95	Susceptible	Susceptible	10 27	19 92	10 84	18 6	14 62	29 4
96	Susceptible	Susceptible	7 12	17 39	7 95	13 39	18 82	22 22
97	Susceptible	Susceptible	14 67	28 22	11 19	21 08	17 58	0
98	Susceptible	Susceptible	4 53	12 95	4 81	11 64	9 66	23 02
99	Susceptible	Susceptible	10 77	21 18	11 58	17 79	18 51	0
100	Susceptible	Susceptible	7 99	17 73	8 85	16 06	12 42	26 34
101	M41L M184V T215Y	K103N V179E	12 41	18 47	11 79	23 48	30 81	18 42
102	Susceptible	Susceptible	8 7	10 88	9 74	14 93	13 51	10 44
103	Susceptible	Susceptible	13 84	25 22	15 47	21 92	17 94	32 91
104	Susceptible	Susceptible	10 75	22 61	11 63	18 11	20 9	23 96
105	Susceptible	Susceptible	21 21	35 51	13 56	23 64	23 48	0
106	Susceptible	Susceptible	12 53	15 6	9 13	14 53	15 12	26 36
107	Susceptible	Susceptible	12 56	26 96	18 33	22 18	20 97	0
108	Susceptible	Susceptible	11 77	21 92	15 95	26 05	15 83	25 38
109	Susceptible	Susceptible	29 52	0	31 12	38 92	34 09	0
110	Susceptible	Susceptible	24 37	0	17 73	27 9	31 1	0
111	Susceptible	Susceptible	24 78	0	18 3	29 95	33	0
112	Susceptible	Susceptible	16 54	27 39	18 17	25 18	26 29	0
113	M41L L74I M184V L210W T215Y	K103N V108I	21 7	13 83	0	30 95	0	28 35
114	M184V	K103N P225H	20 99	17 66	15 36	33 77	31 1	15 17
115	Susceptible	Susceptible	26 2	35 1	24 12	0	30 37	0
116	M184V	K103N P225H	28 09	20 65	35 6	0	0	31 45
117	M184V	K103N	36 87	19 23	16 66	30 21	0	19 89

		P225H						
118	M41L L74I M184V	K103N V179E P225H	23	26 78			0	30 92
					24 76	32 34		
119	Susceptible	K103N P225H	17 89	29 99	18 91	23 81	0	27 07
120	L74V M184V	L100I K103N	25 24	16 16	10 92	24 68	27 39	9 68
121	Susceptible	Susceptible	34 25	0	24 33	0	29 71	0
122	D67N K70R, M184V T215Y K219E	K101E G190S	0	0			0	0
					35 95	26 24		
123	K70R, M184V	K103N P225H	0	20 4	22 84	35 9	0	19 93
124	M41L L74I M184V L210W T215Y	K103N V108I	0	22 14			34 04	23 48
					0	34 47		
125	Susceptible	Susceptible	17 5	17 1	11 33	14 9	26 5	37 56
126	D67G K70E M184V	K101Q K103N Y188L	0	22 69			38 06	18 96
					22 73	27 86		
127	D67N K70R, M184V T215Y K219E	L100I A71T	27 44	18 18			0	23 32
					24 48	0		
128	K65R, D57N M184V K219E	K101E Y181C G190S	30 28	27 01			24 35	0
					23 29	36 17		
129	M184V	Y188L	0	20 67	16 82	32 98	27	0
130	Susceptible	Susceptible	29 55	38 03	34 03	0	36 49	0
131	Susceptible	K103N	20 97	30 53	19 23	33 13	21 82	19 48
132	D67N K70R, M184V T215Y K219Q	V179D Y188L	39 17	25 3			22 72	0
					38 09	32 5		
133	M184V	K101E K10 3N G190A	27 47	14 39	12 28	17 57	33 43	20 13
134	L74I M184V	K103N V10 8I P225H	19 37	15 84	23 55	0	31 15	15 76
135	Susceptible	Susceptible	0	24 14	22 8	24 72	0	25 61

136	Susceptible	Susceptible	26 21	21	30 49	34 04	0	25 64
137	Susceptible	Susceptible	35 57	0	23 11	0	35 77	26 71
138	D67N K70R, M184V T215F K219Q	K101H V106M G190A	31 17	19 87	0	35 02	34 4	0
139	Susceptible	Susceptible	38 68	17 99	20 32	37 66	22 65	17 21
140	Susceptible	Susceptible	16 16	32 66	17 57	27 05	18 98	0
141	Susceptible	Susceptible	13 12	22 24	14 7	24 49	21 88	26 08
142	M41L M184V	K103S V10 6M G190A	0	0	0	0	0	0
143	M41L E44D M184V L210W T215Y	Y188L	35 62	33 15	24 19	36 25	33 86	0
144	Susceptible	K101Q	0	0	0	0	0	0
145	M184V	K103N V108I	27 24	19 14	0	25 5	24 36	0
146	Susceptible	Susceptible	16 64	30 67	16 42	25 47	19 23	0
147	Susceptible	Susceptible	22 78	16 98	17 44	19 35	0	22 01
148	Susceptible	Susceptible	15 37	26 01	19 67	0	27 84	0
149	Susceptible	Susceptible	8 03	17 99	12 63	30 38	13 32	14 17
150	M184V	K101Q K103N	13 67	23 73	16 53	31 9	24 18	0
151	Susceptible	Susceptible	18 29	30 17	19 43	28 94	20 15	0
152	Susceptible	Susceptible	34 65	29 44	21 46	0	0	31 81
153	V118I	Susceptible	14 11	18 41	20 61	0	30 32	0
154	A62V K65R, M184V	L100I K103N	25 35	31 94	24 96	0	24 95	0
155	Susceptible	Susceptible	21 42	0	23 31	0	20 65	35 52
156	Susceptible	Susceptible	20 35	14 2	14 46	16 83	28 11	10 21
157	Susceptible	Susceptible	21 49	26 06	18 26	31 85	22 75	38 45

158	D67N K70 R,M184V T215I K219 Q	K101Q K10 3N V108I P225H	29 01	0			35 59	0
					26 87	0		
159	L74I M184V	K103N V10 8I V179E P 225H	16 38	23 05			22 46	0
					14 51	19 77		
160	E44D	K103N	15 24	15 03			26 34	21 96
					14 72	34 02		
161	Susceptible	Susceptible	25 4	10 43			29 03	16 77
					10 49	18 85		
162	Susceptible	K101Q	19 99	35 2			20 84	19 26
					15 41	31 82		
163	L74I	K103 V108I	10 99	22 39			21 15	31 37
					10 44	20 79		
164	M184V K219R	K103N P225H	7 54	16 28			14 89	30 89
					12 62	28 02		

VIII BIBLIOGRAFIA

Abrams E J (2004) Prevention of mother to child transmission of HIV successes controversies and critical questions AIDS Rev 6 131-43

Aleman S Soderberg K Visco Comandini U Sitbon G Sonnerborg A (2002) Drug resistance at low viraemia in HIV 1 infected patients with antiretroviral combination therapy AIDS 16(7) 1039 44

Allan J S Coligan J E (1985) Major Glycoprotein Antigens that Induce Antibodies in AIDS Patients are Encoded by HTLV III Science 228 1091 1094

Altman D Bland JM (1994) Statistics Notes Diagnostic tests 1 sensitivity and specificity BMJ 308 1552

Avila Rios S Sued O Rhee S Y Shafer R W Reyes Teran G & Ravasi G (2016) Surveillance of HIV transmitted drug resistance in Latin America and the Caribbean A systematic review and meta analysis PLoS ONE 11(6)
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0158560>

Bailey JR Sedaghat AR, Kieffer T Brennan T Lee PK Wind Rotolo M Haggerty CM Kamireddi AR, Liu Y Lee J Persaud D Gallant JE Cofrancesco J Jr Quinn TC Wilke CO Ray SC Siliciano JD Nettles RE Siliciano RF (2006) Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is

dominated by a small number of invariant clones rarely found in circulating CD4+ T cells
J Virol 80(13) 6441-57

Baldum Melanie Mark Oette Martin P Daumer Daniel Hoffmann Herbert J Pfister Rolf Kaiser (2009) Prevalence of minor variants of HIV strains at reverse transcriptase position 103 in therapy naive patients and their impact on the virological failure J Clin Virol 45(1) 34-8

Barre Sinoussi F Chermann JC Rey F Nugeyre MT Chamaret S Gruest J Dauguet C Axler Blin C Vézinet Brun F Rouzioux C Rozenbaum W Montagnier L (1983) Isolation of a T lymphotropic Retrovirus From a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) Science 220 868-71

Battegay M Fluckiger U Hirschel B & Furrer H (2007) Late presentation of HIV infected individuals Antiviral Therapy 12(6) 841-851

Bennett D E Bertagnolio S et al (2008) The World Health Organization's Global Strategy for Prevention and Assessment of HIV Drug Resistance Antiviral Therapy 13 Suppl 2 1-13

Bergroth T A Sonnerborg (2005) Discrimination of lamivudine resistant minor HIV 1 variants by selective real time PCR J Virol Methods 127(1) 100-7

Bergroth T Ekici H Gisslen M Hagberg L Sonnerborg A (2009) Difference in drug resistance patterns between minor HIV 1 populations in cerebrospinal fluid and plasma HIV Med 10(2) 111-5

Bergroth T Ekici H Gisslen M Loes SK Goh LE Freedman A Lampe F Johnson MA Sonnerborg A (2009) Selection of drug resistant HIV 1 during the early phase of viral decay is uncommon in treatment naive patients initiated on a three- or four drug antiretroviral regimen including lamivudine J Med Virol 81(1)

- Bieniasz P D (2009) The Cell Biology of HIV 1 Virion Genesis Cell Host and Microbe 5 550
558
- Briones C de Vicente A Molina Paris C Domingo E (2006) Minority memory genomes can influence the evolution of HIV 1 quasispecies in vivo Gene 384 129 38
- Boletín estadístico 2010 Republica de Panama Departamento de Registros y Estadísticas de Salud Direccion Nacional de Planificacion Ministerio de Salud 2011 p 113
- Boyer PL Sarafianos SG Arnold E Hughes SH (2001) Selective Excision of AZTMP by Drug Resistant Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase Journal ofVirology 75 4832–4842
- Burke D S (1997) Recombination in HIV an Important Viral Evolutionary Strategy Emerging Infectious Diseases 3 253 259
- Chan D C Fass D (1997) Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein Cell 89 263–273
- Chen Z Telfier P Gettie A Reed P Zhang L Ho DD Marx PA (1996) Genetic Characterization of New West African Simian Immunodeficiency Virus SIVsm Geographic Clustering of Household Derived SIV Strains with Human Immunodeficiency Virus Type 2 Subtypes and Genetically Diverse Viruses from a Single Feral Sooty Mangabey Troop Journal of Virology 70 3617–3627
- Cheung PK Wynhoven B Harrigan PR (2004) 2004 Which HIV 1 Drug Resistance Mutations are Common in Clinical Practice? AIDS Reviews 6 107 116
- Clavel F Hance A J (2004) HIV Drug Resistance New England Journal of Medicine 350 1023 1035

Connick E Lederman MM Kotzin BL Spritzler J Kuritzkes DR St Clair M Sevin AD Fox L Chiozzi MH Leonard JM Rousseau F D Arc Roe J Martinez A Kessler H Landay A (2000) Immune Reconstitution In The First Year Of Potent Antiretroviral Therapy And Its Relationship To Virologic Response *The Journal of Infectious Diseases* 181 358-363

De Mulder M York V Wiznia, A Michaud H Nixon D Holguin A & Rosenberg M (2014) HIV-1 drug resistance prevalence, drug susceptibility and variant characterization in the Jacobi Medical Center paediatric cohort, Bronx, NY, USA *HIV Medicine* 15(3) 135-143 <http://doi.org/10.1111/hiv.12089>

Delaugerre C Mouroux M Yvon Groussin A Simon A Angleraud F Huraux JM Agut H Katlama C Calvez V (2001) Prevalence and Conditions of Selection of E44D/A and V118I Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Mutations in Clinical Practice *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 946-948

Detsika M G Chandler B Khoo S H Winstanley C Cane P Back D J & Owen A (2007) Detection and quantification of minority HIV isolates harbouring the D30N mutation by real-time PCR amplification *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60(4) 881-884 <http://doi.org/10.1093/jac/dkm281>

Erice A Mayers DL Strike DG Sannerud KJ McCutchan FE Henry K Balfour HH Jr (1993) Primary Infection with Zidovudine Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 *New England Journal of Medicine* 328 1123-1124

Flys T S D Donnell et al (2007) Persistence of K103N containing HIV-1 variants after single-dose nevirapine for prevention of HIV-1 mother-to-child transmission *J Infect Dis* 195(5) 711-5

Gallo RC Salahuddin SZ Popovic M Shearer GM Kaplan M Haynes BF Palker TJ Redfield R Oleske J Sfaali B (1984) Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) From Patients with AIDS and at Risk for AIDS *Science* 224 500-3

- Gao F Bailes E Robertson DL Chen Y Rodenburg CM Michael SF Cummins LB Arthur LO Peeters M Shaw GM Sharp PM Hahn BH (1999) Origin of HIV 1 in the Chimpanzee *Pan Troglodytes Troglodytes* Nature 397 436 441
- Garcia Lerma, J G (2005) Diversity of Thymidine Analogue Resistance Genotypes Among Newly Diagnosed HIV 1 Infected Persons Journal of Antimicrobial Chemotherapy 56 265–269
- Gardner EM Burman WJ Steiner JF Anderson PL Bangsberg DR (2009) Antiretroviral medication adherence and the development Of Class specificantiretroviral Resistance AIDS 23 1035 1046
- Geijtenbeek T B van Kooyk Y (2003) DC SIGN a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV 1 transmission Current Topics in Microbiology and Immunology 276 31 54
- Gelderblom HR, Hausmann EH Ozel M Pauli G Koch MA (1987) Fine Structure of Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Immunolocalization of Structural Proteins Virology 156 171 176
- Gentile M Adrian T Scheidler A Ewald M Dianzani F Pauli G Gelderblom HR (1994) Determination of the Size of HIV Using Adenovirus Type 2 as an Internal LengthMarker Journal of Virological Methods 48 43 52
- Goedert JJ Biggar RJ Melbye M Mann DL Wilson S Gail MH Grossman RJ DiGirola RA Sanchez WC Weiss SH (1987) Effect of T4 Count and Cofactors on the Incidence of AIDS in homosexual men infected with human immunodeficiencyvirus Journal Of the American Medical Association 257 331 334
- Gonzales MJ Wu TD Taylor J Belitskaya I Kantor R, Israelski D Chou S Zolopa AR, Fessel WJ Shafer RW (2003) Extended Spectrum of HIV 1 Reverse Transcriptase Mutations in Patients Receiving Multiple Nucleoside Analog Inhibitors AIDS 17 791–799

Grievink H Stowell K M (2008) Identification of Ryanodine Receptor 1 Single Nucleotide Polymorphisms by High Resolution Melting Using the LightCycler 480 System *Analytical Biochemistry* 374 396 404

Halvas EK Aldrovandi GM Balfe P Beck IA Boltz VF Coffin JM Frenkel LM Hazelwood JD Johnson VA Kearney M Kovacs A Kuritzkes DR, Metzner KJ Nissley DV Nowicki M Palmer S Ziermann R Zhao RY Jennings CL Bremer J Brambilla D Mellors JW (2006) Blinded multicenter comparison of methods to detect a drug resistant mutant of human immunodeficiency virus type 1 at low frequency *J Clin Microbiol* 44(7) 2612 4

Harrigan PR¹ Mo T Wynhoven B Hirsch J Brumme Z McKenna P Pattery T Vingerhoets J Bachelier LT (2005) Rare Mutations at Codon 103 of HIV 1 Reverse Transcriptase can Confer Resistance to Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors *AIDS* 19 549 554

Heneine W (2010) When do minority drug resistant HIV 1 variants have a major clinical impact? *The Journal of Infectious Diseases* 201(5) 647-649 <http://doi.org/10.1086/650545>

Higuchi R Fockler C Dollinger G Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions *Biotechnology* 11 1026-1030

John E P Simen B B Turenchalk G S Braverman M S Abbate I Aerssens J Moreno E (2016) A follow up of the multicenter collaborative study on HIV 1 drug resistance and tropism testing using 454 ultra deep pyrosequencing *PLoS ONE* 11(1) 1-17 <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0146687>

Johnson VA Brun Vezinet F Clotet B Gunthard HF Kuritzkes DR, Pillay D Schapiro JM Richman DD (2009) Update of the Drug Resistance Mutations in HIV 1 December 2009 *Topics In HIV Medicine* 17 138 145

Keele BF Van Heuverswyn F Li Y Bailes E Takehisa J Santiago ML Bibollet Ruche F Chen Y Wain LV Liegeois F Loul S Ngole EM Bienvenue Y Delaporte E Brookfield JF Sharp PM Shaw GM Peeters M Hahn BH (2006) Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV 1 *Science* 313 523 526

Klein KC Reed JC Lingappa, JR (2007) Intracellular Destinies Degradation Targeting Assembly and Endocytosis of HIV Gag *AIDS Reviews* 9 150 161

Knipe DM Howley PM (2007) *Fields's Virology Vol II* Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia

Kozal MJ Shafer RW Winters MA Katzenstein DA Merigan TC (1993) A Mutation in Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Decline in CD4 Lymphocyte Numbers in Long Term Zidovudine Recipients *The Journal of Infectious Diseases* 167 526 532

Kuiken C Leitner T (2009) *HIV Sequence Compendium 2009* Los Alamos National Laboratory Theoretical Biology and Biophysics Los Alamos New Mexico LA UR 09 03280

Kwong PD Wyatt R, Robinson J Sweet RW Sodroski J Hendrickson WA (1998) Structure of an HIV gp120 Envelope Glycoprotein in Complex with the CD4 Receptor and a Neutralizing Human Antibody *Nature* 393 648 659

Lalezari JP Henry K O'Hearn M Montaner JS Piliero PJ Trottier B Walmsley S Cohen C Kuritzkes DR, Eron JJ Jr Chung J DeMasí R, Donatucci L Drobnes C Delehanty J Salgo M TORO 1 Study Group (2009) Enfuvirtide an HIV 1 Fusion Inhibitor for Drug Resistant HIV Infection in North and South America *The New England Journal of Medicine* 348 2175 2185

Li J Z Kozal M J Baldwin M Jakobsen M R Masquelier B Johnson J A Kuritzkes D R (2011) Low Frequency HIV 1 Drug Resistance

Li J Z & Kuritzkes D R (2013) Clinical implications of HIV 1 minority variants *Clinical*

Loubser S Balfe P Sherman G Hammer S Kuhn L Morris L (2006) Decay of K103N Mutants in Cellular DNA and Plasma RNA After Single Dose Nevirapine to Reduce Mother to Child HIV Transmission *AIDS* 20 995–1002

Lozzi Lepri A Noguera Julian M Di Giallonardo F Schuurman R Dumer M Aitken S Brockmeyer N (2015) Low frequency drug resistant HIV 1 and risk of virological failure to first line NNRTI based ART A multicohort European case control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(3) 930–940 <http://doi.org/10.1093/jac/dku426>

Luber A D (2005) Genetic Barriers to Resistance and Impact on Clinical Response *MedscapeGeneral Medicine* 7 69

Martinez Picado J Martinez M A (2008) HIV 1 Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance Mutations and Fitness A View From the Clinic and *ex vivo* *Virus Research* 134 104–123

Martins S Ramos M J Fernandes P A (2008) The Current Status of the NNRTI Family of Antiretrovirals Used in the HAART Regime Against HIV Infection *Current Medicinal Chemistry* 15 1083–1095

Mellors J W Bazmi H Z (1995^a) Novel Mutations in Reverse Transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reduce Susceptibility to Foscarnet in Laboratory and Clinical Isolates *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 1087–1092

Mellors J W¹ Kingsley L A Rinaldo C R Jr Todd J A Hoo B S Kokka R P Gupta P (1995^b) Quantitation of HIV 1 RNA in Plasma Predicts Outcome After Seroconversion *Annals of Internal Medicine* 122 573–9

Menendez Arias L (2008) Mechanisms of Resistance to Nucleoside Analogue Inhibitors of HIV 1 Reverse Transcriptase *Virus Research* 134 124–146

Metzner K J Bonhoeffer S Fischer M Karanickolas R Allers K Joos B Cohort H I V (2003) Emergence of Minor Populations of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Carrying the M184V and L90M Mutations in Subjects Undergoing Structured Treatment Interruptions

Metzner KJ Giulieri SG Knoepfel SA Rauch P Burgisser P Yerly S Gunthard HF Cavassini M (2009) Minority quasispecies of drug resistant HIV 1 that lead to early therapy failure in treatment naive and adherent patients *Clin Infect Dis* 48(2) 239–47

Metzner KJ Rauch P Walter H Boesecke C Zollner B Jessen H Schewe K Fenske S Gellermann H Stellbrink HJ (2005) Detection of minor populations of drug resistant HIV 1 in acute seroconverters *AIDS* 19(16) 1819–25

Metzner K J Rauch P von Wyl V Leemann C et al (2010) Efficient suppression of minority drug resistant HIV type 1 (HIV 1) variants present at primary HIV 1 infection by ritonavir boosted protease inhibitor containing Antiretroviral therapy *J Infect Dis* 201 1063–71

Musey L Hughes J Schacker T Shea T Corey L McElrath MJ (1997) Cytotoxic T Cell Responses Viral Load And Disease Progression In Early Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection *New England Journal of Medicine* 337 1267–1274

Murillo W Paz Bailey G Morales S Monterroso E Paredes M Dobbs T et al Transmitted drug resistance and type of infection in newly diagnosed HIV 1 individuals in Honduras *J Clin Virol* 2010 49 239–44

Nanfack A J Agyingi L Noubiap J J N Ngai J N Colizzi V & Nyambi P N (2015) Use of amplification refractory mutation system PCR assay as a simple and effective tool to detect HIV 1 drug resistance mutations *Journal of Clinical Microbiology* 53(5)

Nermut MV Grief C Hashmi S Hockley DJ (1993) Further Evidence of Icosahedral Symmetry in Human and Simian Immunodeficiency Virus *AIDS Research and Human Retroviruses* 9 929–938

Nicot F Saliou a Raymond S Saune K Dubois M Massip P Izopet J (2012) Minority variants associated with resistance to HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors during primary infection *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 55(2) 107–113 <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.06.018>

Núñez Martín AE Mastelari M Guerrero G Pascale JM Panama HIV/AIDS epidemiological situation 1984–2009 [conference presentation] At XVIII International AIDS Conference Vienna, 18–23 July 2010

Ohtaka, H Freire E (2005) Adaptive Inhibitors of the HIV-1 Protease *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 88 193–208

ONUSIDA (2017) Reporte El Sida en cifras Ginebra, Suiza 3–9

Palmer S Boltz V Maldarelli F Kearney M Halvas EK Rock D Falloon J Davey RT Jr Dewar RL Metcalf JA Mellors JW Coffin JM (2006) Selection and persistence of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistant HIV-1 in patients starting and stopping non-nucleoside therapy *AIDS* 20(5) 701–710

Palmer S Boltz V Martinson N Maldarelli F Gray G McIntyre J Mellors J Morris L Coffin J (2006) Persistence of nevirapine resistant HIV-1 in women after single dose nevirapine therapy for prevention of maternal to fetal HIV-1 transmission *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18) 7094–7099

Paredes R Marconi VC Campbell TB Kuritzkes DR (2007) Systematic evaluation of allele-specific real-time PCR for the detection of minor HIV-1 variants with pol and env resistance mutations *J Virol Methods* 146(1–2) 136–146

Paredes R Lalama CM Ribaud HJ Schackman BR, Shikuma C Giguél F Meyer WA 3rd Johnson VA Fiscus SA DAquila RT Gulick RM Kuritzkes DR AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5095 Study Team (2010) Pre existing minority drug resistant HIV 1 variants adherence and risk of antiretroviral treatment failure *J Infect Dis* 201 pp 662 671

Perelson AS Neumann AU Markowitz M Leonard JM Ho DD (1996) HIV 1 Dynamics *in vivo* Virion Clearance Rate Infected Cell Life Span and Viral Generation Time *Science* 271 1582 6

Phillips AN Lee CA Elford J Janossy G Timms A Bofill M Kernoff PB (1991) Serial CD4 Lymphocyte Counts and Development of AIDS *Lancet* 337 389 392

Piatok M Jr Saag MS Yang LC Clark SJ Kappes JC Luk KC Hahn BH Shaw GM Lifson JD (1993) High Levels of HIV 1 in Plasma During all Stages of Infection Determined by Competitive PCR *Science* 19 1749 5174

Pingen M Nijhuis M de Bruijn J a Boucher C a B & Wensing A M J (2011) Evolutionary pathways of transmitted drug resistant HIV 1 *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(7) 1467–1480 <http://doi.org/10.1093/jac/dkr157>

Polilli E Parruti G Cosentino L Sozio F Saracino A Consorte A Fazii P (2009) Rapid and persistent selection of the K103N mutation as a majority quasispecies in a HIV1 patient exposed to efavirenz for three weeks a case report and review of the literature 3 9132 <http://doi.org/10.4076/1752.1947.3.9132>

Pollard V W Malim M H (1998) The HIV 1 Rev Protein *Annual Review of Microbiology* 52 491–532

Preston B D Poesz B J Loeb L A (1988) Fidelity of HIV 1 Reverse Transcriptase *Science* 242 1168 1171

- Rath B A von Kleist M Castillo M E Kolevic L Caballero P Soto Castellares G Oberhelman R A (2013) Antiviral Resistance and Correlates of Virologic Failure in the first Cohort of HIV Infected Children Gaining Access to Structured Antiretroviral Therapy in Lima, Peru A Cross Sectional Analysis *BMC Infectious Diseases* 13(1) 1 [http //doi org/10 1186/1471 2334 13 1](http://doi.org/10.1186/1471-2334-13-1)
- Rhee SY (2015) HIV 1 Drug Resistance Mutations Potential Applications for Point of Care Genotypic Resistance Testing Unpublished Manuscript University Stanford
- Ren J Stammers DK (2008) Structural Basis For Drug Resistance Mechanisms For Non Nucleoside Inhibitors of HIV Reverse Transcriptase *Virus Research* 134 157–170
- Roberts JD Bebenek, K Kunkel TA (1988) The Accuracy of Reverse Transcriptase from HIV 1 *Science* 242 1171 1173
- Saracino A Monno L Scudeller L Cibelli DC Tartaglia A Punzi G Torti C Lo Caputo S Mazzotta F Scotto G Carosi G Angarano G (2006) Impact of Unreported HIV 1 Reverse Transcriptase Mutations on Phenotypic Resistance to Nucleoside and Non Nucleoside Inhibitors *Journal of Medical Virology* 78 9–17
- Shafer RW (2002) Genotypic Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance *Clinical Microbiology Reviews* 15 247–277
- Shafer RW Schapiro JM (2008) HIV 1 Drug Resistance Mutations an Updated Framework for the Second Decade of HAART *AIDS Reviews* 10 67 84
- Sichtig N Sierra S Kaiser R Daumer M Reuter S Schuler E Altmann A Fatkenheuer G Dittmer U Pfister H Esser S (2009) Evolution of Raltegravir Resistance During Therapy *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64 25–32

Simon V Ho D D Karim Q A (2006) HIV/AIDS Epidemiology Pathogenesis

Siliciano JD Kajdas J Finzi D Quinn TC Chadwick K Margolick JB Kovacs C Gange SJ Siliciano RF (2003) Long term follow up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV 1 in resting CD4+ T cells *Nat Med* 9(6) 727 8

Svicher V Sing T Santoro MM Forbici F Rodriguez Barrios F Bertoli A Beerenwinkel N Bellocchi MC Gago F dArminio Monforte A Antinori A Lengauer T Ceccherini Silberstein F Perno CF (2006) Involvement of Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Mutations in the Regulation of Resistance to Nucleoside Inhibitors *Journal of Virology* 80 7186–7198

Tochikura TS Nakashima H Yamamoto N (1989) Antiviral Agents with Activity Against Human Retroviruses *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2 441 447

Toni T a, Asahchop E L Moisi D Ntemgwa, M Oliveira M Masquelier B Wainberg M a (2009) Detection of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 M184V and K103N minority variants in patients with primary HIV infection *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(4) 1670–1672 <http://doi.org/10.1128/AAC.01494.08>

Tozzi V (2010) Pharmacogenetics of Antiretrovirals *Antiviral Research* 85 190 200

Veronese FD DeVico AL Copeland TD Oroszlan S Gallo RC Sarngadharan MG (1985) Characterization of gp41 as the Transmembrane Protein Coded by the HTLV III/LAV Envelope Gene *Science* 229 1402 1405

Vignoles M Barboni G Agosti M R Quarleri J Garcia, M K Ayala, S G & Salomon H (2009) Evaluation of minority populations of HIV type 1 with K103N and M184V drug resistance mutations among children in Argentina *Antiviral Therapy* 14(8) 1175–81 <http://doi.org/10.3851/IMP1461>

Weller IVD Williams IG (2001) ABC of AIDS Antiretroviral Drugs British Medical Journal 322 1410-1412

WHO/UNAIDS (2015) Towards Universal Access Scaling Up Priority HIV/AIDS Interventions in the Health Sector Progress Report 2015 WHO Press Geneva

Wind Rotolo M Durand C Cranmer L Reid A Martinson N Doherty M Jilek BL Kagaayi J Kizza A Pillay V Laeyendecker O Reynolds SJ Eshleman SH Lau B Ray SC Siliciano JD Quinn TC Siliciano RF (2009) Identification of nevirapine resistant HIV 1 in the latent reservoir after single dose nevirapine to prevent mother to child transmission of HIV 1 J Infect Dis 199(9) 1301-9

Zheng YH Lomsin N Peterlin BM 2005 Newly Identified Host Factors Modulate HIV Replication Immunology Letters 97 225-234

Zhuang J Jetzt AE Sun G Yu H Klarmann G Ron Y Preston BD Dougherty JP (2002) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Recombination Rate Fidelity and Putative Hot Spots Journal of Virology 76 11273-11282