



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

**Diagnóstico serológico y molecular de VIH-1 a partir
de sangre seca en población adulta de Kinshasa.
Estudio genotípico y resistencia a los
antirretrovirales**

David Barquín Calle



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

Diagnóstico serológico y molecular de VIH-1 a partir de sangre seca en población adulta de Kinshasa. Estudio genotípico y resistencia a los antirretrovirales

Memoria presentada por **D. David Barquín Calle** para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Navarra en el Programa de Doctorado de Medicina Aplicada y Biomedicina.

Fdo. David Barquín Calle

El presente trabajo ha sido realizado bajo la Dirección de los siguientes Profesores en los Departamentos de **Microbiología y Parasitología**, y **Medicina Preventiva y Salud Pública** y autorizamos su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 4 de noviembre de 2021

Dr. Gabriel Reina González

Dra. Silvia Carlos Chillerón

A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar del sufrimiento, pero el mar sería menos si le faltara esa gota.

Madre Teresa de Calcuta

Agradecimientos

Llegado al final del sendero uno mira atrás, observa y reflexiona de todo lo que ha vivido y de con quienes ha compartido el camino. Unos se quedan, pero otros avanzan contigo, por eso quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes personas.

En primer lugar, a mis directores, Gabi y Silvia, por hacer posible este trabajo y por los conocimientos, consejos y orientación durante estos 4 años, 5 si tenemos en cuenta el máster con el que empecé este viaje para llevar a cabo la tesis.

A todos los trabajadores y responsables en Kinshasa que han sido parte fundamental de este equipo, por su ayuda, colaboración y trabajo realizado allí en RDC con todos los pacientes.

A Mirian, Dr. Leiva, Dr. Rubio, José Luis y África que me han acompañado a lo largo de toda la tesis doctoral y de los cuáles he podido aprender mucho gracias a su profesionalidad y entrega.

A todas las técnicas del laboratorio de Microbiología de la CUN, Yas, Arancha, Fernanda, Aitziber, Patri, Mari Carmen, Maika, Irantzu y Cris que me han aguantado cada una, sin excepción, me han acogido desde el primer momento con un cariño enorme y se han preocupado siempre por mi hasta el final.

A Marta, Mariano, Leire y Leti, siempre quedará el recuerdo de los buenos momentos vividos en la sala de residentes y fuera de ella, y los que están por llegar.

A todos mis amigos de Pamplona, Madrid, Málaga, Sevilla, Barcelona y demás ciudades de España por las que están repartidas que tanto se han interesado por el estado de este trabajo desde que empecé y han estado hasta el final, y con los que tantas cosas he podido compartir desde hace muchos años.

En especial agradecimiento a mis padres, que me han dado todo lo que tengo a base de constancia, generosidad y muchos sacrificios en la vida. Gracias.

Finalmente, a Nieves por su continuo apoyo, generosidad, cariño y ejemplo que de ella recibo cada día. Su alegría, constancia y sobre todo paciencia han permitido que esté escribiendo estas líneas que dan lugar a la finalización de esta gran empresa.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Historia y epidemiología del VIH/SIDA	3
1.2	Estructura y genoma del VIH	4
1.3	Variabilidad genética del VIH	6
1.3.1	Tasa de mutación o error	6
1.3.2	Cuasiespecies	7
1.3.3	Diversidad genética y clasificación del VIH	9
1.3.3.1	Tipos de VIH	9
1.3.3.2	Grupos y subtipos	10
1.3.3.3	Formas circulantes recombinantes (CRFs)	12
1.3.4	Distribución geográfica de las variantes genéticas del VIH	16
1.3.5	Diversidad genética del VIH-1 en la República Democrática del Congo.	20
1.3.6	Implicaciones clínicas de la diversidad genética	21
1.4	Ciclo Biológico del VIH y parámetros virológicos e inmunológicos	22
1.4.1	Parámetros virológicos e inmunológicos	26
1.5	Diagnóstico y seguimiento de la infección por VIH	28
1.5.1	Diagnóstico serológico	29
1.5.2	Carga viral	31
1.5.3	Seguimiento inmunológico: linfocitos T CD4+	32
1.6	Tratamiento de la infección VIH y resistencia a antirretrovirales	33
1.6.1	Fármacos antirretrovirales	35
1.6.2	Tratamiento en África Sub-Sahariana	38
1.6.3	Fracaso Viroológico	39
1.6.4	Adherencia al tratamiento antirretroviral	40
1.6.5	Resistencias al tratamiento antirretroviral (TAR)	41
1.6.5.1	Resistencia a inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos	42
1.6.5.2	Resistencia a inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos	43
1.6.5.3	Resistencia a los inhibidores de proteasa.	44
1.6.5.4	Resistencias a los inhibidores de integrasa.	45
1.6.6	Técnicas de detección de resistencias	46
1.6.6.1	Técnicas fenotípicas	46
1.6.6.2	Técnicas genotípicas	47
1.6.6.3	Resistencias en la RDC	48
1.7	Muestras en gota de sangre seca (Dried Blood Spots)	49
1.7.1	Carga viral en DBS	51
1.7.2	Detección de resistencias a los antirretrovirales en DBS	52
1.7.3	Genotipado en DBS	54
1.8	Objetivo 95-95-95	55
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
3	MATERIAL Y MÉTODOS	67
3.1	Diseño y población de estudio	69
3.2	Diagnóstico de infección VIH en la RDC	70
3.3	Recogida de muestras de sangre seca (DBS)	70
3.3.1	Transporte, almacenamiento y manipulación de los DBS	71
3.4	Diagnóstico serológico	72
3.4.1	Elecsys HIV combi PT (Roche)	72
3.4.2	Minividas (VIDAS HIV Duo Quick, Biomérieux)	75

3.4.3	Geenius (HIV 1/2 Confirmatory Assay, BioRad)	76
3.5	Carga Viral	79
3.5.1	<i>GeneXpert® HIV-1 Viral Load (Cepheid)</i>	80
3.5.2	<i>COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)</i>	81
3.6	Caracterización molecular del VIH	82
3.6.1	Dianas de detección y primers	82
3.6.2	Elución y extracción de ácidos nucleicos	84
3.6.3	Retrotranscripción	84
3.6.4	Nested RT-PCR	85
3.6.5	Secuenciación	88
3.6.5.1	Purificación del ADN previa a la secuenciación	88
3.6.5.2	Reacción de Secuenciación	89
3.6.5.3	Subtipado	91
3.6.5.4	Mutaciones de Resistencia	92
3.7	Análisis estadístico	94
3.8	Aspectos éticos	94
4	RESULTADOS	97
4.1	Características de la población de estudio.	99
4.2	Diagnóstico serológico a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa	99
4.2.1	Diagnóstico serológico VIH mediante técnicas de <i>Elecsys® COBAS e411 (HIV COMBI PT Roche)</i> y <i>VIDAS® HIV Duo Quick (bioMérieux)</i>	99
4.2.2	Diagnóstico serológico VIH mediante test Geenius VIH 1/2 (Geenius, Bio-Rad, EE. UU)	102
4.2.3	Diagnósticos erróneos en la República Democrática del Congo	103
4.2.3.1	Análisis de muestras con resultado VIH indeterminado en la República Democrática del Congo	105
4.2.4	Diagnóstico serológico a partir de DBS de otras infecciones en RDC	107
4.3	Diagnóstico molecular a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa	111
4.3.1	Comparación métodos de elución DBS para cuantificación viral	111
4.3.2	Comparación sistemas de cuantificación para cuantificación viral a partir de DBS	113
4.3.3	Análisis de los DBS mediante <i>COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)</i> . Cuantificación de carga viral.	115
4.4	Caracterización molecular de VIH-1 a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa	118
4.4.1	Estudio genotípico de VIH-1 en Kinshasa	118
4.4.1.1	Descripción de la población VIH estudiada	118
4.4.1.2	Prevalencia de subtipos y formas recombinantes en Kinshasa	120
4.4.1.3	Comparación de herramientas para determinación de subtipo/CRF de VIH-1	123
4.4.2	Prevalencia de mutaciones de resistencia de VIH-1 en Kinshasa, RDC.	128
4.4.2.1	Análisis del gen de la transcriptasa inversa	129
4.4.2.2	Análisis del gen de la proteasa	132
4.4.2.3	Análisis del gen de la integrasa	133
4.4.2.3.1	Polimorfismos genéticos asociados con rutas de resistencia en el gen de la integrasa	134
4.4.3	Predicción de los niveles de resistencia de VIH-1 en Kinshasa	137
4.4.3.1	Análisis del gen de la transcriptasa inversa	139
4.4.3.2	Análisis del gen de la proteasa	142
4.4.3.3	Análisis del gen de la integrasa	143

4.5	Adherencia al tratamiento antirretroviral y asociación con el desarrollo de mutaciones de resistencia en Kinshasa	145
5	DISCUSIÓN	151
5.1	Diagnóstico serológico a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa.	153
5.2	Cuantificación molecular a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa	159
5.3	Caracterización molecular de VIH-1 y estudio de mutaciones de resistencia a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa	163
5.4	Adherencia al tratamiento antirretroviral y asociación con el desarrollo de mutaciones de resistencia en Kinshasa	173
6	CONCLUSIONES	181
7	BIBLIOGRAFÍA	187
A N E X O	I	188
A N E X O	I I	188
A N E X O	I I I	188

Índice de Tablas

Tabla 1.1 Proteínas estructurales del VIH-1.	5
Tabla 1.2 Clasificación del VIH.	12
Tabla 1.3 Formas circulantes recombinantes (CRFs) del VIH-1 y subtipos formantes.	14
Tabla 1.4 Fármacos antirretrovirales para la infección VIH.	36
Tabla 1.5 Mutaciones principales de resistencia a inhibidores de proteasa.	45
Tabla 1.6 Mutaciones principales de la resistencia a los inhibidores de integrasa.	45
Tabla 1.7 Tipos de tarjetas para muestras biológica.	51
Tabla 3.1 Características técnicas de las determinaciones realizadas mediante <i>Elecsys HIV combi PT (Roche) (COBAS e411)</i> en función de la diana.	74
Tabla 3.2 Características técnicas de las determinaciones realizadas por Minividas (<i>VIDAS HIV Duo Quick, Biomérieux</i>) en función de la diana.	76
Tabla 3.3 Conjunto de bandas que contiene cada <i>cassette</i> de <i>Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay</i> .	77
Tabla 3.4 Criterio de interpretación de los resultados de VIH-1 y VIH-2 de <i>Geenius</i> según la combinación de bandas.	79
Tabla 3.5 Características principales de las técnicas serológicas para la detección de la infección por VIH.	79
Tabla 3.6 Características de las técnicas de cuantificación viral de VIH-1.	82
Tabla 3.7 Pares de primers VIH-1 para la amplificación de la región de la Transcriptasa Inversa (RT).	83
Tabla 3.8 Pares de primers VIH-1 para la amplificación de la región de la proteasa (PR).	83
Tabla 3.9 Pares de primers VIH-1 para la amplificación de la región de la integrasa (INT).	83
Tabla 3.10 Componentes de Máster mix volúmenes y concentraciones.	85
Tabla 3.11 Condiciones utilizadas para la optimización de la <i>RT-PCR</i> con la enzima KAPA.	87
Tabla 3.12 Condiciones de amplificación de PR, RT, INT para la <i>RT-PCR</i> con <i>TaqGold</i> .	87
Tabla 3.13 Condiciones de amplificación de PR, RT, INT para la <i>RT-PCR</i> con <i>KAPA Biosystem</i> .	88
Tabla 4.1 Resultados resumidos para el diagnóstico serológico del VIH en España a partir de muestras de DBS de Kinshasa (RDC), a través de ensayos analíticos para el diagnóstico del VIH en DBS.	101
Tabla 4.2 Datos de intensidad de banda del <i>Geenius HIV 1/2 (Geenius, Bio-Rad, EE. UU.)</i>	102
Tabla 4.3 Características y resultados detallados de las pruebas de los participantes con un diagnóstico erróneo local falso positivo.	104
Tabla 4.4 Características y resultados detallados de las pruebas de los participantes con un resultado indeterminado del VIH por PDR locales.	106
Tabla 4.5 Resultados de la infección por VHA y VIH.	107
Tabla 4.6 Resultados de las determinaciones realizadas por ambas técnicas para VHB según detección de HBsAg.	107
Tabla 4.7 Resultados de la detección de HBsAg con detección simultánea por <i>COBAS</i> y <i>VIDAS</i> según infección por VIH.	108
Tabla 4.8 Resultados de las determinaciones realizadas por ambas técnicas para VHB según detección de Anti-HBc II.	108
Tabla 4.9 Resultados de la exposición a VHB y VIH, según la detección de Anti-HBc II por ambas técnicas.	109
Tabla 4.10 Resultados de las determinaciones realizadas para la detección de Anti-VHC.	109
Tabla 4.11 Resultados de la coinfección por VHC y VIH según la detección de Anti-VHC.	110
Tabla 4.12 Resultados de la infección por HTLV y VIH.	110
Tabla 4.13 Resultados de la infección por sífilis y VIH.	111
Tabla 4.14 Cuantificación de ARN VIH-1 en 49 DBS de adultos con VIH-1 usando un mismo ensayo molecular (Roche) pero dos productos de elución <i>buffer SPEX Roche®</i> y <i>buffer de lysis NucliSENS® easyMAG®</i> .	112
Tabla 4.15 Cuantificación de la CV del VIH-1 en 116 DBS de adultos con VIH-1 usando dos ensayos moleculares.	114

Tabla 4.16 Resultados resumidos del diagnóstico serológico y molecular de VIH en España a partir de muestras de Kinshasa (RDC).	116
Tabla 4.17 Características de los pacientes y las muestras analizadas para secuenciación de VIH en Kinshasa (RDC).	119
Tabla 4.18 Concordancia del genotipado realizado con dos herramientas online (Stanford HIV Database y Geno2pheno) con respecto al análisis filogenético.	123
Tabla 4.19 Mutaciones de resistencia presentes en las muestras de pacientes VIH+ según la combinación de mutaciones frente a los ARVs.	128
Tabla 4.20 Polimorfismos estudiados en posiciones críticas de desarrollo de mutaciones de resistencia en la integrasa en relación al subtipo.	135
Tabla 4.21 Codones de los polimorfismos estudiados en posiciones críticas de desarrollo de mutaciones de resistencia en la integrasa.	136
Tabla 4.22 Patrones de resistencia de cepas de VIH-1 con mutaciones de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa de nucleósidos (ITIANs).	140
Tabla 4.23 Patrones de resistencia de cepas de VIH-1 con mutaciones de resistencia a los inhibidores de transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINANs).	141
Tabla 4.24 Patrones de resistencia de cepas de VIH-1 con mutaciones de resistencia a los inhibidores de proteasa.	143
Tabla 4.25 Patrones de resistencia de cepas de VIH-1 con mutaciones de resistencia a los inhibidores de integrasa.	144
Tabla 4.26 Acceso y adherencia al tratamiento antirretroviral de los pacientes VIH+ con experiencia en TAR (pacientes TAR y desconocidos con TAR).	145
Tabla 4.27 Mutaciones de resistencia asociadas a las variables de adherencia estudiadas.	146

Índice de Figuras

Figura 1.1 Corte transversal de la estructura de una partícula vírica de VIH. _____	4
Figura 1.2 Organización del genoma del VIH-1. _____	5
Figura 1.3 Representación esquemática de la dinámica de la cuasiespecie viral. _____	8
Figura 1.4 Epidemiología molecular de la variante no M del VIH-1. Representación de la distribución del grupo O, del VIH-1. _____	17
Figura 1.5 Epidemiología molecular de las variantes no M del VIH-1. Representación de la distribución de los grupos N y P del VIH-1. _____	17
Figura 1.6 Mapa de distribución global de los subtipos y recombinantes del VIH-1. _____	20
Figura 1.7 Ciclo biológico del VIH-1. _____	23
Figura 1.8 Representación de la entrada del VIH-1. _____	24
Figura 1.9 Esquema de la evolución clínica, inmunológica y vírica de la infección aguda, reciente y crónica por VIH-1 así como los marcadores serológicos de la infección. _____	27
Figura 1.10 Desarrollo de las pruebas de screening. Días transcurridos hasta positivizar la infección por VIH-1. _____	29
Figura 1.11 Mecanismo de resistencia de RT a ITIANs mediante escisión fosforilítica. _____	42
Figura 1.12 Mecanismo de Resistencia a ITIANs mediante la disminución de afinidad. _____	43
Figura 1.13 Mecanismo de resistencia a ITINANs mediante inhibición alostérica. _____	44
Figura 1.14 Proteasa del VIH-1. Proteasa <i>wild type</i> y Proteasa con mutaciones de resistencia que producen baja afinidad a los IPs. _____	44
Figura 1.15 Datos globales VIH 2020. Cascada de pruebas y tratamiento. _____	55
Figura 1.16 Objetivos 90-90-90 en África Central y Occidental en 2019. _____	56
Figura 1.17 Estimaciones epidémicas de la República Democrática del Congo, 90-90-90 en 2019. _____	57
Figura 3.1 Gotas de sangre seca en Tarjetas de transporte biológico <i>Whatman Paper 903 Protein Saver Card (Schleiche & Schuell, USA)</i> . _____	70
Figura 3.2 Flujo de trabajo a partir de una tarjeta DBS inoculada con sangre. _____	71
Figura 3.3 Elución del DBS para la realización de las técnicas serológicas. _____	72
Figura 3.4 Detección de un complejo inmune mediante electroquimioluminiscencia. _____	73
Figura 3.5 Equipo completo <i>Elecsys COBAS e411 (HIV COMBI PT Roche)</i> . _____	74
Figura 3.6 Equipo <i>MiniVidas (VIDAS HIV Duo Quick, Biomérieux)</i> . _____	75
Figura 3.7 SPR (<i>Solid Phase Receptacle</i>) o cassette y puntas específicas. _____	75
Figura 3.8 Esquema gráfico del proceso para realizar la inmunocromatografía <i>Geenius</i> . _____	76
Figura 3.9 <i>Cassette Geenius BioRad</i> . _____	78
Figura 3.10 Equipo <i>GeneXpert® HIV-1 Viral Load (Cepheid)</i> . _____	80
Figura 3.11 Equipo <i>COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)</i> . _____	81
Figura 3.12 Equipo <i>Perkin Elmer 9700 Applied Biosystems</i> . _____	86
Figura 3.13 Equipo <i>CFX96-Real SystemC1000 Thermal Cycler</i> . _____	86
Figura 3.14 <i>Kit GE HealthCare</i> para purificación de bandas de amplificación de geles. _____	89
Figura 3.15 Electroferograma correspondiente a secuencia del fragmento de proteasa del virus VIH-1. _____	90
Figura 3.16 Página principal <i>Geno2Pheno</i> para introducir de las secuencias. _____	91
Figura 3.17 Resultados obtenidos una vez comparada nuestra secuencia. _____	91
Figura 3.18 Vista de la página principal de la base de datos de <i>Stanford</i> para mutaciones de resistencia. _____	92
Figura 3.19 Información acerca de las mutaciones de resistencia, susceptibilidad a antirretrovirales y subtipo probable. _____	93
Figura 4.1 Resumen del diagnóstico de VIH a través de PDR y análisis de DBS de pacientes atendidos en Kinshasa (RDC). _____	100
Figura 4.2 Correlación entre los buffers <i>Lysis de EasyMag</i> y <i>SPEX</i> mediante <i>COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)</i> en 32 muestras con VIH-1 positivo y carga viral cuantificada. _____	113

Figura 4.3 Correlación entre los ensayos <i>GeneXpert-CV</i> y <i>COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)</i> en 100 muestras con VIH-1 positivo y carga viral cuantificada. Diagrama de dispersión de las 100 muestras que se detectaron y cuantificaron por ambos ensayos. _____	115
Figura 4.4 Carga viral de los pacientes VIH-1 procedentes de Kinshasa según su experiencia con el tratamiento antirretroviral (TAR). _____	117
Figura 4.5 Caracterización actual por epidemiología molecular en la cohorte de estudio de las secuencias de pacientes de VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2019. _____	121
Figura 4.6 Caracterización actual por epidemiología molecular en la cohorte de estudio de las secuencias de pacientes de VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2019 según su experiencia en TAR. _____	122
Figura 4.7 Comparación de la caracterización por epidemiología molecular en la cohorte de estudio de las secuencias de proteasa (PR) de pacientes de VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2019. _____	125
Figura 4.8 Comparación de la caracterización por epidemiología molecular en la cohorte de estudio de las secuencias de transcriptasa inversa (RT) de pacientes de VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2019 _____	126
Figura 4.9 Comparación de la caracterización por epidemiología molecular en la cohorte de estudio de las secuencias de integrasa (INT) de pacientes de VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2019. _____	127
Figura 4.10 Porcentaje de las cepas de VIH-1 que albergan mutaciones de resistencia a los antirretrovirales ITIANs, ITINANs, IP e INI considerando la carga viral de los pacientes. ____	129
Figura 4.11 Representación de las mutaciones de resistencia frente a los inhibidores análogos de transcriptasa inversa (ITIAN) presentes en las muestras secuenciadas pol (RT) en los pacientes VIH-1 de Kinshasa, RDC. _____	130
Figura 4.12 Representación de las mutaciones análogas de timidina presentes en las muestras secuenciadas pol (RT) en los pacientes VIH-1 de Kinshasa, RDC. _____	131
Figura 4.13 Representación de las mutaciones de resistencia frente a los inhibidores no análogos de transcriptasa inversa (ITINAN) presentes en las muestras secuenciadas pol (RT) en los pacientes VIH-1 de Kinshasa, RDC. _____	131
Figura 4.14 Representación de las mutaciones de resistencia frente a los inhibidores de proteasa (IP) presentes en las muestras secuenciadas pol (RT) en los pacientes VIH-1 de Kinshasa, RDC. _____	132
Figura 4.15 Representación de las mutaciones de resistencia frente a los inhibidores de integrasa (INI) presentes en las muestras secuenciadas pol (RT) en los pacientes VIH-1 de Kinshasa, RDC. _____	133
Figura 4.16 Predicción de la sensibilidad a fármacos antirretrovirales según Stanford en pacientes con secuencias pol disponibles. _____	138
Figura 4.17 Asociación entre la adherencia y la prevalencia de las mutaciones K103N y M184V, los niveles de CD4 y la carga viral. _____	149

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ANRS: *Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales* (Agencia Nacional Francesa para la Investigación de SIDA)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARV: Antirretroviral

ASS: África Subsahariana

COI: *Cut-off index* (índice de corte)

CRF: *Circulating Recombinant Form* (forma circulante recombinante)

DBS: *Dried Blood Spot* (Gota de sangre seca)

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

GALT: *Gut-Lymphoid Associated Tissue*

HTLV: *Human T-cell lymphotropic virus* (Virus linfotrópico de células T humanas)

IC: Intervalo de confianza

INI: Inhibidor de la integrasa

IP: Inhibidor de la proteasa

ITIAN: Inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido

ITINAN: Inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósido

LIA: *Line-immunoassays* (Inmunoensayos en línea)

LAV: *Lymphadenopathy Associated Virus* (virus asociado a linfadenopatía)

Log: Logaritmo decimal

LTR *Long Terminal Repeat*

NGS: *Next Generation Sequencing* (Secuenciación de nueva generación o masiva)

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONUSIDA: Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (solución salina tamponada con fosfato)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

PDR: Prueba de diagnóstico rápido

PR: Proteasa

RFV: *Relative Fluorescence Value* (valor fluorescente relativo)

rpm: Revoluciones por minuto

RT: Retrotranscriptasa o transcriptasa inversa

SPR: *Solid Phase Receptacle* (cassette)

SIDA: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida

TAM: *Thymidine Analogue Mutation* (mutación de análogos de timidina)

TAR: Tratamiento antirretroviral

TARGA: Terapia antirretroviral de gran actividad

VHA: Virus de la hepatitis A

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VIS: Virus de inmunodeficiencia de los simios.

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

WB: *Western blot*

Fármacos Antirretrovirales frente al VIH

Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)idos (ITIAN)

3TC: Lamivudina

ABC: Abacavir

AZT: Zidovudina

DDI: Didanosina

D4T: Estavudina

FTC: Emtricitabina

TDF: Tenofovir disoproxil fumarato

Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN)

DOR: Doravirina

EFV: Efavirenz

ETR: Etravirina

NVP: Nevirapina

RPV: Rilpivirina hidrocloreuro

Inhibidores de la proteasa (IP)

("r" indica coadministración con ritonavir en baja dosis como potenciador farmacológico)

ATV/r: Atazanavir

DRV/r: Darunavir

FPV/r: Fosamprenavir

IDV/r: Indinavir sulfato

LPV/r: Lopinavir

NFV: Nelfinavir

SQV/r: Saquinavir

TPV/r: Tipranavir

Inhibidores de la integrasa (INI)

BIC: Bictegravir

DTG: Dolutegravir

EVG: Elvitegravir

RAL: Raltegravir

CÓDIGOS DE NUCLEÓTIDOS:

A: Adenina C: Citosina G: Guanina T: Timina

CÓDIGOS DE AMINOÁCIDOS:

A: Alanina	M: Metionina
C: Cisteína	N: Asparagina
D: Ácido aspártico	P: Prolina
E: Ácido glutámico	Q: Glutamina
F: Fenilalanina	R: Arginina
G: Glicina	S: Serina
H: Histidina	T: Treonina
I: Isoleucina	V: Valina
K: Lisina	W: Triptófano
L: Leucina	Y: Tirosina

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Historia y epidemiología del VIH/SIDA

A principios del siglo XX comenzaron a aparecer e identificarse los primeros **retrovirus** gracias a la pericia de varios investigadores al detectar de la presencia de agentes transmisibles desconocidos en animales causándoles leucemias y tumores. Actualmente, la teoría más aceptada por la comunidad científica sobre el origen del **Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)** (retrovirus) afirma que fue debido a una transmisión zoonótica y posterior mutación del VIScpz de chimpancés (Virus de Inmunodeficiencia de los simios) en África central y occidental (Gao, 1999). El paso al hombre probablemente fue durante el proceso de caza, carnicería y tráfico de primates a principios del siglo XX, que junto con la inmigración y globalización dio lugar a la pandemia actual del VIH/SIDA.

En 1982, se reconoció de manera oficial el término SIDA (Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida) pero el descubrimiento del agente etiológico del SIDA no fue hasta 1983 en el instituto Pasteur, Francia. Fue posible por la investigación del grupo de Luc Montagnier que consiguió aislar el virus, pero se clasificó como virus asociado a linfadenopatía (LAV) ya que procedía de un ganglio de un paciente con una linfadenopatía. Fue en 1986 cuando el Comité Internacional de Taxonomía Viral aceptó finalmente el nombre de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) para este nuevo retrovirus. Unos años más tarde se publicó un estudio en el cual se había conseguido aislar un nuevo retrovirus en 2 pacientes de SIDA en África Occidental, donde el VIH-1 no era endémico. Este nuevo virus compartía características biológicas y morfológicas con el tipo 1 pero difería en varios componentes antigénicos por lo que podían proceder de un ancestro común. Finalmente se denominó VIH-2 (Clavel et al., 1986)

Según las últimas estimaciones, se estima que en el año 2020 hubo alrededor de 4.000 nuevas infecciones de VIH al día en todo el mundo, un 60% en África Sub-Sahariana (ASS), un 90% en adultos y de éstos el 51% se dan en mujeres. Así, en ASS viven alrededor de 25,6 millones de personas con VIH, de las que 870.000 fueron nuevas infecciones y 460.000 muertes (UNAIDS, 2021). Dentro de la región de ASS, en África Occidental y Central viven 4,7 millones de personas con infección por VIH. En el caso de África Oriental y Meridional, se estiman 20,7 millones (18,4 millones-23,0 millones) de personas viviendo con VIH (UNAIDS, 2021). Sin embargo, desde que en los años 90 comenzó el uso de tratamiento antirretroviral (TAR), las infecciones y muertes causadas han ido disminuyendo notablemente.

Actualmente, de los casi 38 millones de personas que viven con VIH en todo el mundo, 27.5 millones (73%) están en tratamiento antirretroviral. Sin embargo, aún queda una gran parte de la población sin cubrir. Desde 2010, se han reducido las nuevas infecciones en un 31% gracias a las estrategias de tratamiento y las políticas nacionales de salud pública (UNAIDS, 2021).

Según las estimaciones de ONUSIDA desde el comienzo de la pandemia hasta 2020 79.3 millones (55.9 millones –110 millones) personas han contraído el VIH y más de 36.3 millones (27.2 millones–47.8 millones) han muerto por este virus y/o por enfermedades relacionadas (<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>)

1.2 Estructura y genoma del VIH

El VIH posee una estructura compleja. Su material genético se encuentra protegido por varias capas de estructuras diferentes. El virión, de forma esférica, con un diámetro de 80-120 nm, está rodeado de una **envoltura** de bicapa lípido-proteica adquirida de la membrana plasmática por el proceso de gemación. En ella se encuentran las proteínas de la envoltura formando 72 proyecciones, formadas por trímeros de proteínas de membrana, encargadas de facilitar la entrada del virus en las células huésped en el proceso de infección. Bajo la envoltura se sitúa la **matriz proteica** y ésta a su vez incluye la **cápside** icosaédrica central que rodea la **nucleocápside** denominada *Core*, densa a los electrones, y contiene el genoma del virus (**Figura 1.1**).

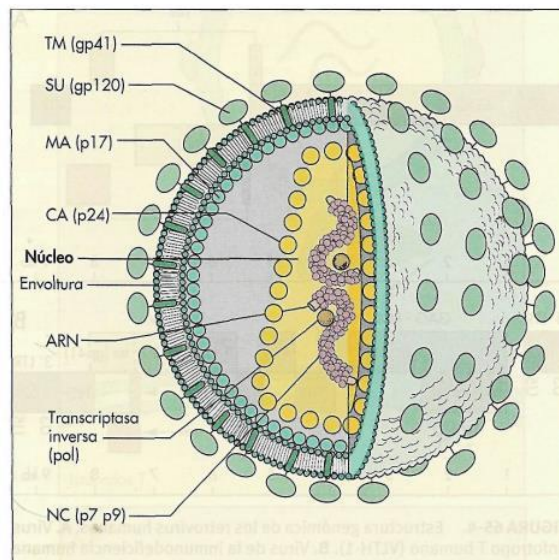


Figura 1.1 Corte transversal de la estructura de una partícula vírica de VIH. ENV: Envoltura, MA: Matriz, CA: Cápside, NC: Nucleocápside, IN: Integrasa, RT: Retrotranscriptasa, PR, Proteasa, ARN: Genoma del virus (Murray et al., 2013).

El material genético está formado por un dímero de **ARN** de cadena sencilla y sentido positivo, con un tamaño aproximado de 9,8 kb (Greene, 1991) (**Figura 1.2**). Su propiedad más relevante radica en la capacidad de codificar genes esenciales permitiendo la regulación de su propia expresión en la célula huésped.

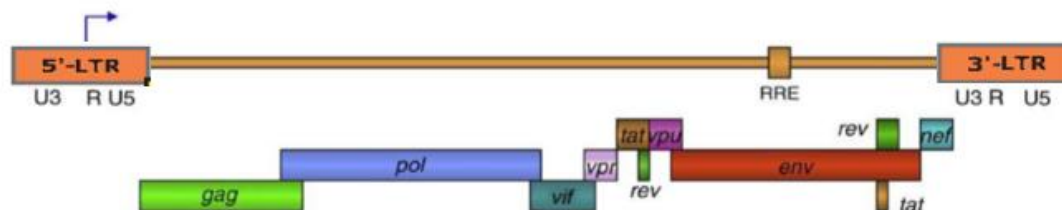


Figura 1.2 Organización del genoma del VIH-1. Adaptado de (Delgado, 2011)

Además, el virión posee dos moléculas de ARN de transferencia y 10-50 moléculas de **ADN polimerasa dependiente de ARN (transcriptasa inversa o retrotranscriptasa)** e **integrasas** (Murray et al., 2013).

Dicho genoma está formado por tres genes estructurales principales denominados *gag*, *pol* y *env* (**Tabla 1.1**) y completado con seis genes de función reguladora, *nef*, *rev*, *tat*, *vif*, *vpr* y *vpu*. Además, una vez está integrado en la célula (provirus) el genoma está flanqueado por varias regiones, unas secuencias repetidas denominadas LTR (*Long Terminal Repeat*) que permiten integrarse en el genoma de la célula huésped y en las que se encuentran los elementos reguladores encargados de la iniciación de la transcripción viral.

Tabla 1.1 Proteínas estructurales del VIH-1. Adaptado de (Delgado, 2011).

Gen	Proteínas	Características y/o funciones
<i>Gag</i>	p55	Precursora de: Antígenos de grupo de proteínas de cápside y núcleo. p17 Proteína de la matriz (MA), tapiza la superficie interna de la envoltura y transporte al núcleo. p24 Proteína de la cápside (CA), antígeno mayoritario.
	p15	Precursora de: Proteínas de la nucleocápside (NC). p9 Proteína unida al ácido nucleico. P7 Proteína rica en prolina; ayuda a la encapsidación del virus (Nucleocápside).
	<i>Pol</i> p90.	Precursora de: Enzimas p66, p51 Transcriptasa inversa (RT) y actividad ARNasa (ADN polimerasa-ARN dependiente) p15 ARNasa H (RN), función endonucleolítica. Corte de Gag/Pol y maduración. p10 Proteasa (PR) rotura proteolítica para dar proteínas maduras. P31 Integrasa (IN), integración del ADNc viral.
<i>Env</i>	gp160.	Precursora de: Proteínas de la envoltura: glicoproteínas.
	gp120 gp41	gp120 Proteína de superficie, interacción con el receptor CD4. gp41 Proteína transmembrana, fusión de la envoltura del virus con la célula.

Los genes *vpx* y *tev*, son menos conocidos y están menos definidos que el resto. Pero el gen *vpx*, codificado por el VIH-2 es responsable de su reducida patogenicidad en comparación con el VIH-1 (Seitz, 2016).

1.3 Variabilidad genética del VIH

La capacidad adaptativa del VIH se fundamenta en la **tasa de error** de las enzimas que participan en la replicación viral, a lo que se puede añadir la recombinación de fragmentos genómicos si varios viriones infectan una misma célula linfocítica; la **cinética de replicación**, con un recambio viral intenso y continuado durante todas las fases de la enfermedad; y la **plasticidad de las proteínas virales**, convirtiendo al VIH en uno de los organismos descritos con mayor tasa evolutiva.

1.3.1 Tasa de mutación o error

Esta tasa se define como el número de bases erróneas incorrectamente incorporadas en un nucleótido por cada ronda de replicación, representando el número de veces que la enzima comete un error en el emparejamiento de las bases.

El potencial aumento de la variabilidad confiere a los virus la capacidad de adaptarse rápidamente a los cambios producidos por la presión selectiva ocasionada por fenómenos inmunológicos o farmacológicos produciendo variantes capaces de eludir esas presiones ya que albergan las mutaciones adecuadas para ello. La base bioquímica de la diferencia en las tasas de error entre los genes virales y los celulares es la actividad exonucleasa 3'-5' (mecanismo corrector de pruebas o *proofreading*) de las ADN polimerasas y retrotranscriptasa del virus. Este mecanismo es capaz de reconocer y eliminar las sustituciones que se han hecho incorrectamente durante la polimerización (Fraser et al., 2014; Smyth et al., 2012). Los virus con genoma de tipo ARN, que durante el proceso de replicación utilizan ARN polimerasas ARN-dependientes o ADN-polimerasas ARN-dependientes (retrovirus) carecen de esta actividad exonucleasa.

La transcriptasa inversa del VIH-1 tiene una tasa de mutación muy alta, de 1.4×10^{-5} sustituciones por cada ronda de replicación junto con la alta cinética de replicación de 10^9 - 10^{10} viriones nuevos diariamente cabe esperar que cometa 1 mutación por cada ciclo replicativo concediéndole al VIH su extrema diversidad genética. La alta tasa de error de esta enzima le ha proporcionado al virus una capacidad intrínseca de alterar el tropismo celular, de escapar del sistema inmune, de desarrollar rápidamente

resistencias a la terapia antiviral, así como de generar las diversas cepas de VIH-1 que han impedido hasta el momento el desarrollo de una vacuna eficaz (Cuevas et al., 2015).

En la variabilidad genética no sólo intervienen las mutaciones puntuales, sino también las duplicaciones, deleciones e inserciones tanto por recombinación homóloga (entre secuencias muy parecidas) como no homóloga (entre secuencias distintas) (Schlub et al., 2010).

1.3.2 Cuasiespecies

Las variantes presentes en el individuo forman un conjunto de poblaciones genéticamente distintas pero que comparten un ancestro o secuencia común. Estas variantes se denominan **cuasiespecies**. Las cuasiespecies están sometidas a un proceso continuo de variación genética, competición y presión, como puede ser la presión selectiva ejercida por el sistema inmune o la presencia de fármacos. Cada uno de los genomas presenta una eficacia biológica distinta, ésta se define, como la capacidad replicativa del virus de producir una nueva progenie infecciosa. Este parámetro determina la capacidad del genoma dentro de la población viral. La secuencia con mayor eficacia biológica es también conocida como **secuencia maestra** y puede dar lugar a ser la secuencia mayoritaria ya que comprenderá las secuencias más homogéneas y frecuentes; el resto de genomas constituyen el espectro de **mutantes** (Domingo et al., 2000)

Las **variantes minoritarias**, son aquellas secuencias en bajas proporciones que se pueden detectar con los métodos de secuenciación de nueva generación, por lo que se detecta una **secuencia consenso o promedio**, es decir, una secuencia formada en cada posición por el nucleótido más frecuente del conjunto de genomas de la población (Briones & Domingo, 2008).

Las cuasiespecies que están adaptadas al ambiente pueden mantener la secuencia consenso estable, aunque la tasa de mutación sea alta debido a un equilibrio entre la población de nuevas mutantes y la eliminación mediante selección negativa de aquellas menos adaptadas. Este equilibrio poblacional depende del equilibrio ambiental y su constancia. Por otro lado, mediante la selección positiva puede darse la generación de nuevas mutantes ya que éstas pueden poseer un componente "X", es decir, una ventaja replicativa que hará que sean seleccionados y se desarrollen. Este fenómeno de hecho ocurre constantemente y es una de las mayores dificultades con las que se enfrenta nuestro sistema inmunológico y el diseño de estrategias antivirales como fármacos o vacunas (Gianella & Richman, 2010).

Otro fenómeno a tener en cuenta es la memoria evolutiva de las cuasiespecies en forma de componentes minoritarios (Briones & Domingo, 2008; Dampier et al., 2016; Domingo & Perales, 2019). En teoría, todas estas variantes circulantes pueden integrarse en forma de provirus en las células y estar representadas en el reservorio de células latentemente infectadas. Si alguno de estos cambios concede una ventaja, como por ejemplo evasión de respuesta inmune o resistencia a los antirretrovirales, esta secuencia podría tener selección positiva (Delgado, 2011).

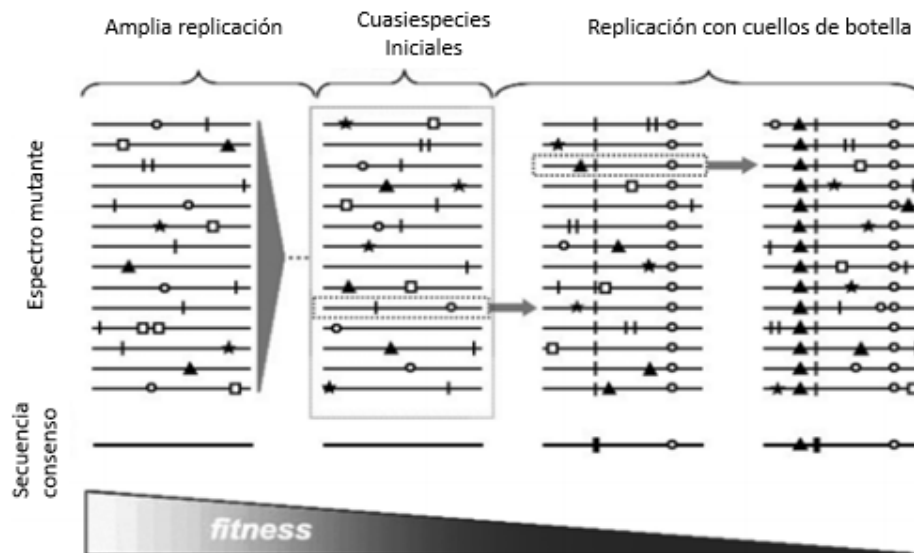


Figura 1.3 Representación esquemática de la dinámica de la cuasiespecie viral. Los genomas individuales se representan por rayas horizontales y los símbolos sobre las rayas representan diferentes mutaciones. La secuencia consenso refleja el nucleótido más frecuente para cada posición. El triángulo grande representa la eficacia biológica o la replicación de las cuasiespecies que origina una nueva cuasiespecie; las flechas pequeñas indican pasos de replicación con cuellos de botella consecutivos que dan lugar a la fijación de las mutaciones presentes en el genoma parental. La replicación de cuellos de botella se produce cuando se aplica una presión selectiva (por ejemplo, en forma de tratamiento antiviral) sobre la cuasiespecies haciendo que las mutaciones de resistencia a los fármacos sean detectables en la secuencia consenso del virus. Adaptada de (Briones & Domingo, 2008)

Según numerosos estudios, se ha demostrado que, a pesar de la exposición continua a múltiples variantes del VIH-1, el subconjunto de variantes de un mismo individuo están filogenéticamente más próximas entre sí que con las variantes de personas no epidemiológicamente relacionadas (Domingo & Perales, 2019).

1.3.3 Diversidad genética y clasificación del VIH

La variabilidad genética del VIH sigue siendo un reto actual, un desafío para el ser humano a nivel sanitario, social y global.

1.3.3.1 Tipos de VIH

El VIH tiene un alto grado de diversidad genética. Se han identificado 2 tipos de VIH: VIH-1 y VIH-2 con un 40-50% de homología genética y organización genómica similar (Rivas et al., 2006). Ambos difieren tanto en su epidemiología como su historia natural. El **VIH-1** es el agente etiológico de la pandemia con origen hace ya 38 años, desde que se identificó como agente causante del SIDA. Por otro lado, el **VIH-2** fue identificado en 1986 y su distribución geográfica está más acotada, afectando de manera más directa a la zona de África Occidental (Campbell-Yesufu & Gandhi, 2011). Este tipo es menos patógeno y transmisible que el VIH-1, debido principalmente a cargas virales más bajas que los pacientes infectados por VIH-1, a diferencias génicas y con recuentos linfocitarios de CD4 superiores y a una fase asintomática mucho más larga, aunque también causa SIDA, que tarda en aparecer de 15-20 años en ausencia de tratamiento antirretroviral (de Cock et al., 1993; de Mendoza et al., 2020; Delgado, 2011; Toro et al., 2004).

El origen zoonótico de estos virus se ha podido evidenciar gracias a distintos factores: similitud en la organización genómica viral, relaciones filogenéticas, prevalencia en el reservorio natural, la coincidencia geográfica y las posibles rutas de transmisión. Según los análisis filogenéticos, el VIH se originó debido a una zoonosis del virus de los simios (SIV) proveniente de los primates no humanos. El VIH-1 llegó a los seres humanos de los grandes simios, más concretamente del chimpancé común (*Pan troglodytes*) evolucionando a partir del SIVcpz en el centro de África. Su origen ha sido laborioso de esclarecer ya que es una especie que habita en zonas poco accesibles en el sur de Camerún. El SIVcpz da lugar a dos cepas de SIV denominadas SIVcpzPts y SIVcpzPtt siendo este último el origen del VIH-1 ya que filogenéticamente, el grupo M es cercano a las cepas de los chimpancés infectados por este virus (Sharp & Hahn, 2011). Por otro lado, el VIH-2 estaba filogenéticamente relacionado y su estructura genómica era idéntica al virus de los monos *sooty mangabeys* (SIVsm), localizados en el oeste de África (Hans et al., 2021; Hemelaar, 2012). El VIH-2 también se ha detectado en otros países que han tenido vínculos históricos y socio-económicos con esta parte de África. Posiblemente se extendió desde Guinea Bissau a Portugal durante la guerra por la independencia del país; y también en otras colonias portuguesas como Angola, Mozambique o Brasil, así como en algunas zonas de la India que mantenían relación

con Portugal (Campbell-Yesufu & Gandhi, 2011; de Mendoza et al., 2020; Lemey et al., 2003).

Diversos estudios demuestran que el origen de la pandemia del VIH-1 se sitúa en la capital de la República Democrática del Congo, Kinshasa, desde dónde se diseminó a otras zonas de ASS, Europa y el resto del mundo (Vidal et al., 2000, 2006); provocando una distribución geográfica de muchas variantes del virus. Las secuencias más antiguas de VIH-1 que se han encontrado allí, datan de 1959-1960 (Worobey et al., 2008; Zhu et al., 1998). A finales de los años 80, la diversidad genética que había en este país era mucho mayor y compleja que en cualquier otra parte del mundo (Bbosa et al., 2019; Faria et al., 2014).

1.3.3.2 Grupos y subtipos

Según los análisis filogenéticos el VIH-1, se clasifica en cuatro grupos: M (*Main* o Principal), N (No M, No O) y O (*Outlier*) que son los tres grupos principales y el grupo P provenientes de saltos inter-especie entre humanos y primates (**Tabla 1.2**) (Alessandri-Gradt et al., 2021; Bbosa et al., 2019). El grupo M es el causante de la pandemia global; se ha propagado a nivel mundial y representa la mayoría de las cepas que se encuentran por todo el globo terrestre. Dentro este grupo se han descrito 9 subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J y K, así como recombinaciones genéticas de los mismos. A su vez, los subtipos A y F están divididos en sub-subtipos, A1 al A4 y F1 y F2, respectivamente (Djoko et al., 2011; Hemelaar, 2012). Los subtipos B y D están muy relacionadas filogenéticamente por lo que se deberían considerar como sub-subtipos (Seitz, 2016). En el caso del subtipo E, previamente se había descrito como un subtipo, pero una vez se analizó la secuencia completa se vio que contenía fragmentos genómicos del subtipo A, por lo que fue renombrado como recombinante: *CRF01_AE* (Foley et al., 2018; Gao et al., 1996). El subtipo B es el más estudiado y del que mayor conocimiento se tiene hasta el momento por ser el mayoritario en países económicamente desarrollados, sin embargo, la mayoría de las infecciones producidas en el mundo se producen por el resto de los subtipos denominados, subtipos no-B. La distancia genética dentro de los subtipos puede llegar a ser de entre el 15-20%, inferior a la existente entre los subtipos que se estiman en torno al 25-30% de distancia genética (Hemelaar et al., 2006, 2019; Taylor et al., 2008).

Tanto el grupo M como N se originaron directamente del *SIVcpzPtt*, de comunidades aisladas de chimpancés localizadas en el sureste y centro sur de Camerún que formaban reservorios naturales dando lugar a estos dos grupos de VIH-1 de manera independiente (Gao, 1999). El grupo N fue identificado en 1998 por un grupo de investigadores de Francia y Camerún, a partir de una cepa de una mujer VIH-1 positiva procedente de Camerún que falleció de SIDA 4 años antes (Mourez et al., 2013; Simon et al., 1998). A diferencia del grupo M, se ha detectado principalmente en la zona de Camerún, teniendo así una diseminación más endémica en la que se han detectado infecciones por el grupo N únicamente en 19 individuos (Alessandri-Gradt et al., 2021; Villabona-Arenas et al., 2015).

El origen y epidemia del grupo O se localiza en Camerún, resultado de transmisión del virus SIV a los gorilas y posiblemente de éste a los humanos (Takehisa et al., 2009). Las infecciones producidas por este grupo se estiman en más de 130.000 individuos por la zona occidental y central de África, en países como Camerún, Gabón y Guinea Ecuatorial principalmente (Ayoubá et al., 2001; Mourez et al., 2013; Villabona-Arenas et al., 2015). La cepa prototipo que dio lugar a este grupo se aisló en 1990 en Bélgica de una pareja camerunesa (de Leys et al., 1990). Por último, el grupo P, identificado en una mujer procedente de Camerún en 2009 la cuál había sido diagnosticada como VIH-1 positivo 5 años antes (Plantier et al., 2009). La relación filogenética entre la cepa y el SIVgor nos muestra al gorila como fuente de este grupo y como posiblemente un intermediario entre el chimpancé y los humanos (Mourez et al., 2013; Vallari et al., 2011; van Heuverswyn et al., 2006).

El VIH-2 se divide en 9 grupos distintos (anteriormente denominados subtipos) que van desde la A hasta la I, siendo el A y, en menor medida el B, los más frecuentes a nivel mundial entre la población humana (Gottlieb et al., 2018; Visseaux et al., 2016). Los datos son limitados en relación a los subtipos, pero se han descrito solamente unos pocos recombinantes (Bbosa et al., 2019). El VIH-2 no se ha diseminado como el VIH-1 debido a su reducida patogenicidad, capacidad replicativa y de transmisión. Esto favorece que las infecciones producidas por este virus sean endémicas, es decir, están limitadas geográficamente a la zona de África Occidental, aunque también se han diagnosticado en otros países de Europa, Estados Unidos e India (Campbell-Yesufu & Gandhi, 2011; de Mendoza et al., 2020). Las estimaciones más recientes, sitúan entre 1-2 millones de infectados por VIH-2 en el mundo, sin embargo, es necesaria la reevaluación de los datos con técnicas más precisas y actuales (Gottlieb et al., 2018).

Tabla 1.2 Clasificación del VIH.

VIH	VIH-1	Grupo M (<i>Main o Principal</i>). Subtipos A-D, F-H, J, K
		Grupo O (<i>Outlier</i>)
		Grupo N (No M, No O)
		Grupo P
	VIH-2	Grupos A-I

1.3.3.3 Formas circulantes recombinantes (CRFs)

El análisis de las regiones de múltiples genomas del VIH y en particular de genomas completos, muestra que la recombinación entre los distintos subtipos es muy frecuente. Se han descrito recombinaciones entre los diferentes subtipos denominadas, formas recombinantes circulantes (CRF) que se encuentran taxonómicamente al mismo nivel que el grupo M. Los CRFs están formadas por la recombinación de fragmentos genómicos de dos subtipos diferentes formando un **genoma mosaico** formado por regiones de ambos subtipos que contienen puntos de recombinación comunes. Se clasifican como **CRFs** aquellas cepas cuyo genoma se ha secuenciado por completo y que se han encontrado en tres o más individuos sin conexión epidemiológica alguna. Por otro lado, las **formas Recombinantes Circulantes complejas (CRF_cpx)**, son aquellas secuencias recombinantes formadas por los fragmentos de más de dos subtipos distintos (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html#CRF01>). Los CRFs pueden ser verdaderos mosaicos formados por una ingente cantidad de subtipos como es el caso del CRF18_cpx y CRF02_cpx, formados por 5 ó 6 subtipos distintos, así como con segmentos no clasificados (Thomson et al., 2005; Vidal et al., 2008).

Además de los CRFs, que juegan un papel importante en la epidemia global, se han descrito lo que se denominan **formas recombinantes únicas o URF**. Son aquellas cepas recombinantes que no cumplen los requisitos para clasificarse como CRFs, ya que se han identificado en 1 ó 2 individuos aislados o grupos con relación epidemiológica (Robertson et al., 2000).

No solo existen las recombinaciones inter-subtipo, sino que diversos estudios han descrito las recombinaciones entre las variantes de un mismo subtipo, denominadas intra-subtipos (Diaz et al., 1995; Zhu et al., 1995); y recombinaciones entre los grupos M y O, denominadas inter-grupos, descritas por primera vez en una paciente de Camerún infectada por ambos grupos (Kiwelu et al., 2013; Takehisa et al., 1999). La mayoría de los estudios se han centrado en las recombinaciones inter-subtipo ya que

son más sencillas de detectar en comparación con las recombinaciones intra-subtipo; las recombinaciones entre variantes de un mismo subtipo poseen una gran similitud en sus secuencias y resultando en mayor complejidad a la hora de su detección y por ello se omiten en los análisis filogenéticos (Rousseau et al., 2007). Por el momento, no se han encontrado recombinaciones entre el VIH-1 y el VIH-2, pero si hay estudios que han descrito la infección dual de pacientes con ambos tipos de VIH en varios países de África y Europa. La primera infección dual fue hallada en Costa de Marfil en 1988 (Requejo, 2006; Requena et al., 2019).

La recombinación en el VIH ocurre tras la infección de dos (infección dual) o más cepas genéticamente diferentes que circulan por una misma zona. Dicha circunstancia puede ocurrir de dos maneras: 1) simultáneamente o tras un breve período de tiempo (**coinfección**), 2) cuando la infección con la segunda cepa se produce de modo secuencial, es decir, una vez establecida la primera infección y la respuesta inmune a ésta (**superinfección o reinfección**) (Allen & Altfeld, 2003; Blackard et al., 2002; Smith et al., 2005). Según varios estudios la superinfección e infecciones duales pueden estar asociadas a una mayor carga viral y a una progresión de la enfermedad más rápida (Grobler et al., 2004; Piantadosi et al., 2007).

La recombinación sucede durante la retrotranscripción y previa a la integración. Requiere de varios requisitos para que se dé. Dos cepas distintas deben infectar una misma célula y los dos provirus deben integrarse en el genoma de la célula huésped. La expresión de ambas secuencias virales junto con el empaquetamiento de los genomas genera una nueva progenie heterocigota. Cuando esta primera generación heterocigota reinfecta a otra célula, es en ésta donde se produce la recombinación. Ambas cadenas de ARN servirán como molde para sintetizar el genoma viral por la transcriptasa inversa formando un virus recombinante. La transcriptasa inversa puede saltar de una cadena molde a otra produciendo así un genoma mosaico de ambos virus parentales. Además, este hecho junto con la co-circulación de diferentes subtipos y grupos en una misma zona, la tasa de replicación de la retrotranscriptasa y su tasa de error durante el proceso hacen que se incremente la posibilidad de generar poblaciones heterocigotas incluso si la infección es en una población homocigota (Blackard et al., 2002; Galletto & Negroni, 2005).

Los recombinantes de VIH-2 son poco frecuentes; hasta la fecha solo se ha descrito un único recombinante denominado, CRF01_AB. Basado en tres aislados de individuos en Japón y un aislado en Coste de Marfil identificado en 1990 (Ibe et al., 2010).

Hoy en día, más de la mitad de los virus aislados son recombinantes permitiendo un salto evolutivo y una resistencia mayor a las presiones selectivas que las mutaciones puntuales. Actualmente, hay constancia de 102 CRFs, descritos y publicados (**Tabla 1.3**). Cada uno es designado por un número identificativo relacionado con el orden cronológico de descubrimiento y los subtipos genéticos que los han originado, colocando en orden alfabético la letra del subtipo infectante. Por último, se ha propuesto la designación de un nuevo subtipo, el **subtipo L**. En 1983 y 1990 en la República Democrática del Congo fueron identificadas dos de las 3 muestras necesarias para designar un nuevo subtipo. Estas muestras (83CD003-AF286236 y 90CD121E12-AF457101) forman una rama distinta de los otros subtipos y CRFs, casi equidistante a los subtipos H y J (Mokili et al., 2002). En 2001, se identificó otra cepa denominada, CG-0018a-01 y clasificada en su momento como posible subtipo L por las secuencias obtenidas de la amplificación de las regiones subgenómicas (*pol/gag/env*). Yamaguchi et al, han conseguido obtener la secuencia completa de esta cepa y proponen que las tres sean clasificadas como subtipo L. Además, ayudará a determinar el origen y edad del subtipo L, así como la identificación de posibles infecciones por subtipo L (Yamaguchi et al., 2020).

Tabla 1.3 Formas circulantes recombinantes (CRFs) del VIH-1 y subtipos formantes (<https://www.hiv.lanl.gov/>).

Nombre	Subtipo origen		Nombre	Subtipo origen
CRF01_AE	A, E		CRF52_01B	CRF01, B
CRF02_AG	A, G		CRF53_01B	CRF01, B
CRF03_AB	A, B		CRF54_01B	CRF01, B
CRF04_cpx	A, G, H, K, U		CRF55_01B	CRF01, B
CRF05_DF	D, F		CRF56_cpx	CRF02, B, G
CRF06_cpx	A, G, J, K		CRF57_BC	B, C
CRF07_BC	B', C		CRF58_01B	CRF01, B
CRF08_BC	B', C		CRF59_01B	CRF01, B
CRF09_cpx	A, G, U		CRF60_BC	B, C
CRF10_CD	C, D		CRF61_BC	B, C
CRF11_cpx	A, E, G, J, U		CRF62_BC	B, C
CRF12_BF	B, F1		CRF63_02A	CRF02, A6
CRF13_cpx	CRF01, A, G, J, U		CRF64_BC	B, C
CRF14_BG	B, G		CRF65_cpx	CRF01, B, C
CRF15_01B	CRF01, B		CRF66_BF1	B, F1
CRF16_A2D	A2, D		CRF67_01B	CRF01, B

CRF17_BF	B, F1		CRF68_01B	CRF01, B
CRF18_cpx	A1, F, G, H, K, U		CRF69_01B	CRF01, B
CRF19_cpx	A1, D, G		CRF70_BF	B, F1
CRF20_BG	B, G		CRF71_BF	B, F1
CRF21_A2D	A2, D		CRF72_BF	B, F1
CRF22_01A1	CRF01, A1		CRF73_BG	B, G
CRF23_BG	B, G		CRF74_01B	CRF01, B
CRF24_BG	B, G		CRF75_01B	CRF01, B
CRF25_cpx	A, G, U		CRF76_01B	CRF01, B
CRF26_A5U	A, U		CRF77_cpx	CRF01, B, C
CRF27_cpx	A, E, G, H, J, K, U		CRF78_cpx	CRF01, B, C
CRF28_BF	B, F1		CRF79_0107	CRF01, CRF07
CRF29_BF	B, F1		CRF80_0107	CRF01, CRF07
CRF30_0206	CRF02, CRF06		CRF81_cpx	B, C, F1
CRF31_BC	B, C		CRF82_cpx	CRF01, B, C
CRF32_06A6	CRF06, A6		CRF83_cpx	CRF01, B, C
CRF33_01B	CRF01, B		CRF84_A1D	A1, D
CRF34_01B	CRF01, B		CRF85_BC	B, C
CRF35_AD	A, D		CRF86_BC	B, C
CRF36_cpx	CRF01, CRF02, A, G		CRF87_cpx	CRF01, B, C
CRF37_cpx	CRF01, CRF02, A, G, U		CRF88_BC	B, C
CRF38_BF	B, F1		CRF89_BF	B, F1
CRF39_BF	B, F1		CRF90_BF1	B, F1
CRF40_BF	B, F1		CRF91_01C	CRF01, C
CRF41_CD	C, D		CRF92_C2U	C, U
CRF42_BF	B, F1		CRF93_cpx	A1, A5, C, CRF02, U
CRF43_02G	CRF02, G		CRF94_cpx	CRF02, B, F2
CRF44_BF	B, F1		CRF95_02B	CRF02, B
CRF45_cpx	A, K, U		CRF96_cpx	CRF01, B, C
CRF46_BF	B, F1		CRF97_xx	
CRF47_BF	B, F1		CRF98_06B	CRF06_cpx, B
CRF48_01B	CRF01, B		CRF99_BF1	B, F1
CRF49_cpx	A1, C, J, K, U		CRF100_01C	CRF01, C
CRF50_A1D	A1, D		CRF101_01B	CRF01, B
CRF51_01B	CRF01, B		CRF102_cpx	CRF01, CRF07

1.3.4 Distribución geográfica de las variantes genéticas del VIH

La expansión y evolución del VIH ha llevado a la distribución mundial de subtipos, CRFs y URFs reflejando la complejidad de la epidemiología molecular del VIH-1. Esta diversidad es uno de los principales obstáculos para alcanzar con éxito una cura total, ya que afecta al desarrollo de una vacuna, la respuesta al TAR y desarrollo de resistencia a los fármacos y diagnóstico.

En un principio, la prevalencia del VIH-1 y VIH-2 era prácticamente igual, pero con una distribución geográfica distinta. El **VIH-1** se localizaba en el Centro y Este del continente africano mientras que el **VIH-2** se limitaba a la zona Occidental. Según varios estudios, el paso del SIV a los humanos se estima alrededor del año 1900 y el origen del grupo M del VIH-1, su ancestro más antiguo varias décadas después, posiblemente en 1920 en el sur de Camerún (Faria et al., 2014; Korber et al., 2000). Sin embargo, hasta la fecha la primera evidencia de infección por VIH-1 grupo M data del año 1959 (Zhu et al., 1998). Las variantes **no-M**, así como el VIH-2 son principalmente endémicas de las zonas de África occidental, sobre todo Camerún y las regiones colindantes y también, aunque en menor medida en África central (**Figura 1.4 y 1.5**). Esto nos da una idea del lugar de origen más probable de todos los grupos de VIH-1. Se han dado casos esporádicos de infecciones producidas por el **grupo O** en otros países de África Occidental como en Chad, Guinea Ecuatorial y Gabón (Bibollet-Ruche et al., 1998; Delaporte Eric et al., 1996). Aunque Camerún sigue siendo el lugar con mayor prevalencia de casos por el grupo O (Vessièrre et al., 2010).

Además, la co-circulación de los grupos M y O ha dado lugar a infecciones duales por ambos grupos asociadas y no asociadas con CRFs. La prevalencia de las infecciones **recombinantes M/O**, así como las infecciones duales es difícil de calcular, pero se han logrado definir 19 formas recombinantes únicas (de Oliveira et al., 2017; Moisan et al., 2020; Njouom et al., 2017; Peeters et al., 1999; Takehisa et al., 1999; Vergne et al., 2003; Yamaguchi et al., 2004).

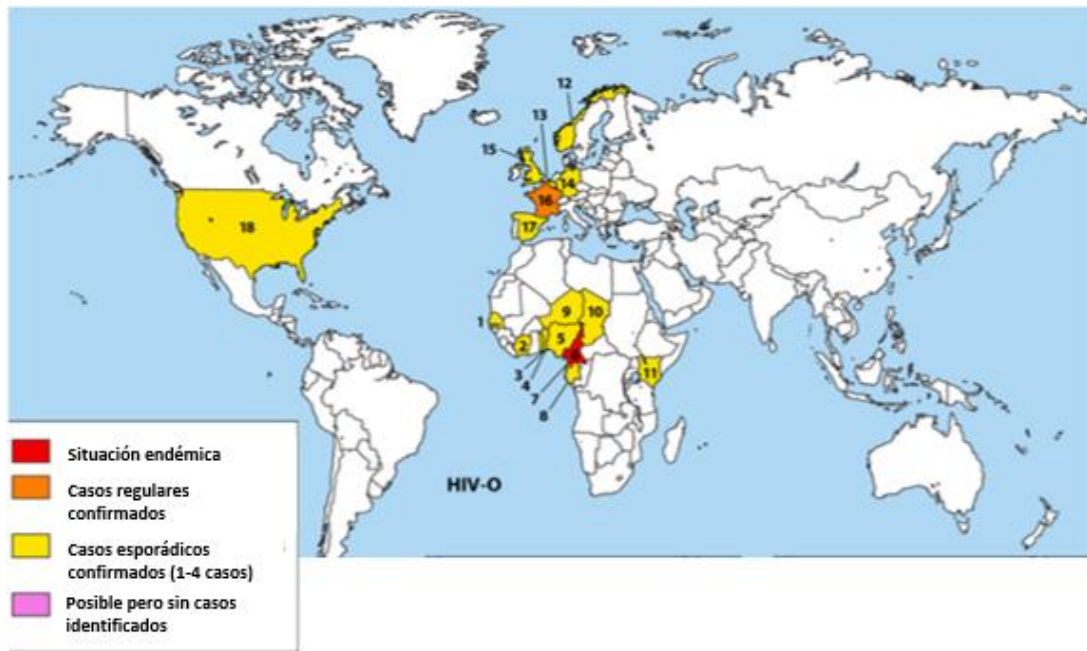


Figura 1.4 Epidemiología molecular de la variante no M del VIH-1. Representación de la distribución del grupo O, del VIH-1. Adaptado de (Mourez et al., 2013).

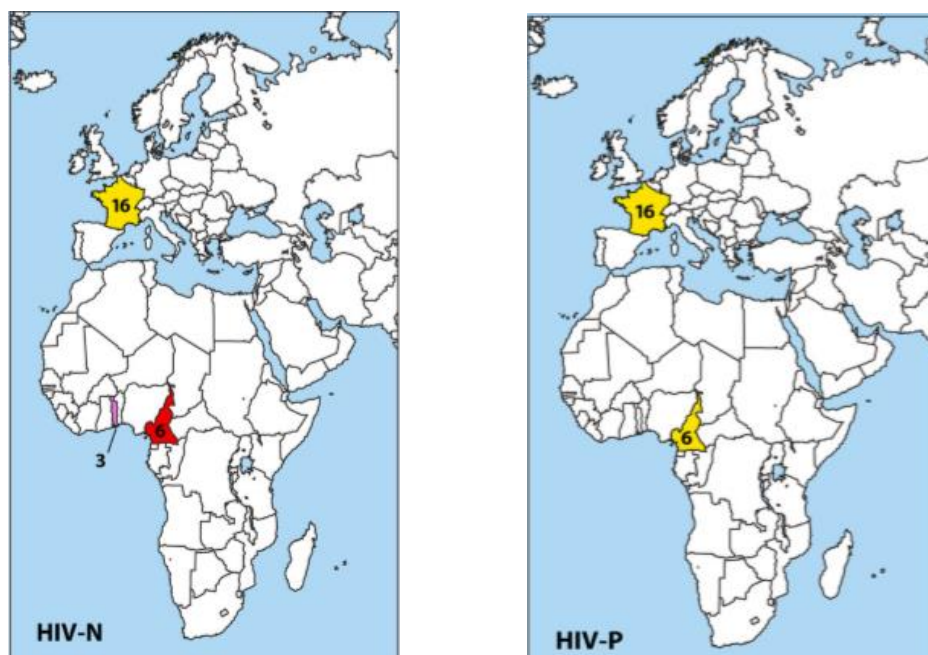


Figura 1.5 Epidemiología molecular de las variantes no M del VIH-1. Representación de la distribución de los grupos N y P del VIH-1. Adaptado de (Mourez et al., 2013).

La infección más antigua de VIH-1 perteneciente al grupo O en Europa data del año 1960, de un marinero noruego que había recorrido puertos probablemente de la zona de África Occidental (Jonassen et al., 1997). Otro estudio reveló y aisló la cepa conocida como *HIV-1vav*, perteneciente a una mujer francesa fallecida en 1992 y que nunca había estado en África. Su hijo falleció en 1981 con 1 año de edad así que ella se infectó antes de 1980 por lo que estos datos indican que el grupo O lleva en Europa más de 40 años (Charneau et al., 1994). Las infecciones producidas por el **grupo N** se localizan mayormente en África Occidental, en Camerún, pero se han identificado infecciones en otro país de África, Togo y en Europa, concretamente en Francia (Delaugerre et al., 2011; Rodgers et al., 2017; Simon et al., 1998; Yamaguchi et al., 2006). Por último, el grupo P, identificado en 2009, es el más reciente de todos y únicamente se han identificado 2 casos de procedencia camerunesa (Vallari et al., 2011).

Globalmente, la distribución y proporción de los **subtipos, CRFs y URFs** varía según la región y con el tiempo (**Figura 1.6**). El subtipo C, es el causante del más del 46% de las infecciones por VIH-1 en el mundo (Gartner et al., 2020; Hemelaar et al., 2011) seguido del subtipo B, A y de los recombinantes CRF02_AG, CRF01_AE. Los subtipos F, H, J y K son los menos prevalentes, un 1% de las infecciones producidas por VIH-1 grupo M desde 1990 hasta 2015. En la década de 2005-2015, las infecciones por subtipo B han aumentado, los subtipos A y D se han mantenido prácticamente estables pero los subtipos C, G y el recombinante CRF02_AG han descendido globalmente. En cambio, el CRF01_AE y otros CRFs y URFs han ido aumentando de manera constante a lo largo de los años (Hemelaar et al., 2019). Si analizamos la diversidad genética en todos los continentes encontramos que en **África** existe la mayor diversidad genética de todos, concretamente en **África Central**, donde coexisten prácticamente todos los subtipos conocidos y la mayoría de CRFs y URFs. Uno de los países con la mayor diversidad del grupo M, es la República Democrática del Congo, ofreciendo una prueba más del origen de la pandemia del VIH. El subtipo C está muy presente en África Central y se ha visto un aumento en la proporción de infecciones por este subtipo al igual que un aumento en CRFs y URFs al mismo tiempo que descienden los niveles de los subtipos A, D, G y H. Esta zona ha sido la principal en albergar la mayor proporción de URFs de cualquier otra región; entre 2010-2015 se estima que el 47% de las infecciones por URFs se daban, en África Central. En la zona de **África Occidental**, el recombinante CRF02_AG es el predominante, aunque también es frecuente la co-circulación en algunos países de los subtipos A y D (Nii-Trebi et al., 2017). En **África Oriental (excepto Etiopía)**, el subtipo A es el más frecuente, causante de más de la mitad de las infecciones, aunque también encontramos los subtipos D y C circulando en menor proporción, así como

bastantes URFS; en Kenia se ha visto un aumento en el subtipo C y un descenso en el subtipo D (Gounder et al., 2017; Hemelaar et al., 2019). En el **Norte y Medio Este de África** encontramos el subtipo B, aunque poco a poco aumentan los CRFs (60% de infecciones en 2015) pero hay que tener en cuenta que en esta región es una de las pocas con menor número absoluto de personas viviendo con VIH (Hemelaar et al., 2019; Sallam et al., 2017). Por último, en el **Sur de África, Etiopía y Sur Asia (India)**, el subtipo C es el más frecuente con casi el 90% de las infecciones de VIH-1. En la India ha habido un aumento en la presencia de URFs en la parte Noreste del país (A. L. Sharma et al., 2017).

En **Europa Occidental y Central, América del Norte, Latino América, Oceanía y el Caribe**, el subtipo B es la cepa predominante, es la más estudiada en todo el mundo, pero solo constituye un 12% de las infecciones a nivel global (Alexiev et al., 2018; Castley et al., 2017; Hebberecht et al., 2018; Hemelaar et al., 2019; Oster et al., 2017; Sallam et al., 2017; Tumiotto et al., 2018; Volz et al., 2018). Aunque en los últimos ha aumentado paulatinamente la prevalencia de subtipos no-B, CRFs y URFS, con un descenso en el subtipo B, sobre todo en los países con inmigración desde África Sub-Sahariana (Hemelaar et al., 2019). La entrada del subtipo B en América fue probablemente vía Haití durante los años 60. Está confirmada la presencia de profesionales haitianos en el Congo poscolonial francófono que acudían a cooperar en tareas sanitarias y educativas. La hipótesis que se plantea es que probablemente uno o varios individuos se infectaran con el subtipo B y lo llevaran de vuelta a su país y mediante la inmigración y turismo se transmitió a la población estadounidense y al resto de países desarrollados (Hemelaar et al., 2011; Thomas et al., 2007).

En **Europa del Este y Asia central**, el subtipo A es el causante del más del 50% de las infecciones por VIH-1 (Rusia y otros países de la antigua Unión Soviética), pero también hay una presencia notable del subtipo B y CRFs como el CRF02_AG, muy frecuente en Kirguistán (Aibekova et al., 2018). En el **Sudeste Asiático** los recombinantes son los más abundantes, principalmente el CRF01_AE, pero también el CRF07_BC y CRF08_BC, en países como China. Tailandia alberga la mayor proporción de infecciones por CRF01_AE de todo el mundo (Hemelaar et al., 2019) desde finales de los años 80 (Mccutchan et al., 1992; Taylor et al., 2008). Actualmente Asia se describe como un “semillero” de virus recombinantes debido a la cantidad de recombinantes detectados en los últimos años (Xiao et al., 2019).

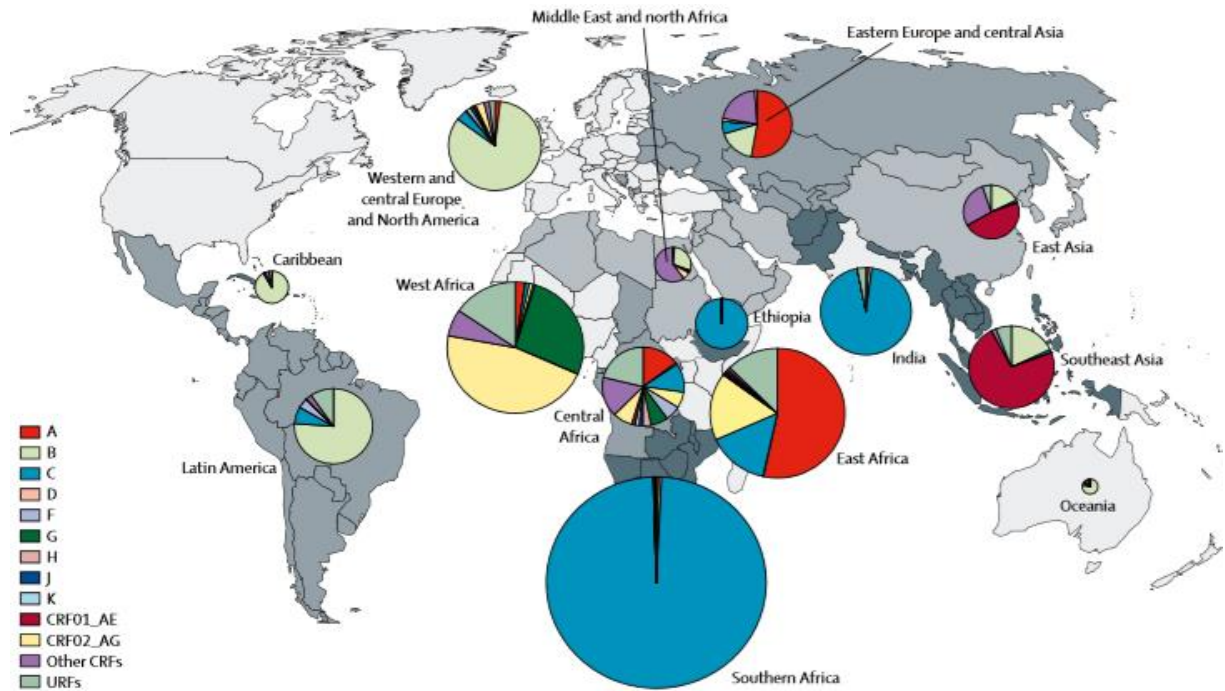


Figura 1.6 Mapa de distribución global de los subtipos y recombinantes del VIH-1 (Hemelaar et al., 2019)

1.3.5 Diversidad genética del VIH-1 en la República Democrática del Congo.

En 1984, el gobierno de la RDC se convirtió en uno de los primeros países de África en respaldar una política nacional de prevención y control del VIH/SIDA. La República Democrática del Congo, incluyendo su capital Kinshasa se caracterizan por exhibir la mayor diversidad genética de VIH-1 dentro de esta región. La diversidad del grupo M es muy interesante, ya que dentro del país la distribución geográfica es muy heterogénea e incluso varias cepas co-circulan en varias regiones al mismo tiempo favoreciendo la coinfección (Ntambwe Erick et al., 2013). Cuando comenzamos este trabajo, según los escasos estudios que existen de RDC, los subtipos A-D, F, G, H, J, K, CRFs (CRF01_AE, CRF02_AG) y algunos URFs estaban presentes hasta el año 2015 (Hemelaar et al., 2019), sin embargo, debido a la alta diversidad en esta zona se requieren más estudios para poder conocer que cepas circulan actualmente en esta región. Un estudio llevado a cabo por *Djoko et al* en 2011 observó que la mayoría de las cepas circulantes albergaban una compleja estructura genómica, muchas de las cuales desarrollaban resistencias frente a los fármacos del TAR. Además, en torno al 5% de las cepas no podían clasificarse en los subtipos o CRFs ya descritos (Djoko et al., 2011).

En consecuencia, Kinshasa es un lugar muy relevante para la implementación de programas de vigilancia de variantes del VIH y aumentar el conocimiento de la epidemiología molecular.

1.3.6 Implicaciones clínicas de la diversidad genética

La diversidad genética del VIH-1 tiene implicaciones en el diagnóstico, tratamiento antirretroviral, patogenicidad, transmisión del virus, desarrollo de resistencias y desarrollo de vacunas eficaces. Esto supone un impacto en la epidemiología del virus, las pautas terapéuticas y en la prevención. Estos cambios genéticos se producen con frecuencia, por lo que el estudio continuo y la caracterización de los subtipos, recombinantes y cepas nuevas es importante (Rivas et al., 2006). Con la globalización los movimientos de las poblaciones han aumentado y con ello los cambios en la distribución de los subtipos del VIH-1 así como la generación de nuevos recombinantes o cepas. Además, la generación de virus recombinantes puede suponer la generación de virus con tropismos diferentes y, quizá, con distinta patogenicidad y virulencia. Por ello, las infecciones por subtipos no-B cada vez son más frecuentes en los países desarrollados (Bezemer et al., 2021) como en América y Europa, donde las infecciones por estos subtipos pueden ser 20-60% (B. G. Brenner et al., 2021). Se ha visto que determinados subtipos (ej. subtipo C) inducen de forma más frecuente el fracaso virológico (Hägglom et al., 2016).

Algunos estudios han mostrado que las **técnicas actuales de detección de anticuerpos** frente al VIH son muy sensibles a la hora de detectar los dos tipos de VIH y los distintos grupos y subtipos del VIH-1; mediante proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de la región de la envuelta del VIH-1, incluyendo el grupo O y N, así como del VIH-2 y el antígeno p24 (con técnicas de cuarta generación). Los **ensayos confirmatorios** detectan tanto el VIH-1 como el VIH-2 mediante antígenos de la envoltura, pero también se dispone de pruebas específicas únicamente para VIH-2. Esto ayuda a la hora de dar un diagnóstico correcto. Sin embargo, en el caso de las **técnicas moleculares y carga viral** existe una amplia variedad y no todas ellas son capaces de detectar diferentes variantes del VIH. Hoy en día las técnicas de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) se basan principalmente en el uso de *primers* tomando como referencia secuencias del subtipo B del VIH-1. Estas técnicas detectan los subtipos del grupo M e incluso varios CRFs y el grupo O y/o N, pero no detectan el VIH-2 (Aguilera Guirao A et al., 2014; Alvarez et al., 2017). Esto supone un posible resultado erróneo dando lugar a un falso negativo o una infravaloración de la carga viral, debido a ciertos subtipos no-B o recombinantes complejos genéticamente diferentes de la cepa B; por ello prestar

atención acerca del rendimiento de las pruebas de cribado actuales y estimula el desarrollo de técnicas diagnósticas, moleculares que aseguren la detección de todas las infecciones por VIH (Toro & Amor Vicente Soriano, 2007). Por tanto, resulta necesaria una evaluación y modificación periódica de esos métodos cuantitativos para obtener unos valores de carga viral reales en las personas con variantes genéticas del VIH distintas del subtipo B, otros tipos, grupos, subtipos o CRFs.

Con relación al desarrollo de **resistencias**, se ha visto que la diversidad afecta al tipo de mutaciones de resistencias, al grado de resistencia, y al tiempo de desarrollo de una resistencia frente al tratamiento antirretroviral. Sin embargo, de un modo general, las mutaciones de resistencia del subtipo B también confieren resistencia a los subtipos no-B (Rivas et al., 2006), es decir, los subtipos no-B junto con los recombinantes, poseen polimorfismos o marcadores genéticos específicos de variante a lo largo del genoma de forma natural; incluyen posiciones concretas de la PR, RT e IN asociadas con la resistencia a los fármacos en los virus del subtipo B (Holguín et al., 2006). Los diferentes subtipos pueden modular la capacidad replicativa del virus, seleccionar nuevas vías de adquisición de resistencia o una adquisición más rápida (B. Brenner et al., 2003; Grossman et al., 2004), modificar la interpretación de los algoritmos de interpretación de resistencia genotípica, reducir la barrera genética para seleccionar resistencia a ciertos fármacos ARV, modificar las afinidades de unión a los fármacos o conferir una gran susceptibilidad (Kinomoto et al., 2005; Yebra et al., 2011).

En el caso del grupo O y el VIH-2 se ha descrito que tienen una resistencia intrínseca a los antirretrovirales no análogos de nucleósidos (Descamps et al., 1997; Tuaille et al., 2004).

1.4 Ciclo Biológico del VIH y parámetros virológicos e inmunológicos

El ciclo biológico se divide en dos etapas: la fase temprana, comienza con la unión de un virión a la superficie celular culminando con la integración del ADN proviral en el genoma de la célula infectada, y la fase tardía, comienza con la transcripción del nuevo genoma viral, así como su procesamiento y termina con la liberación de nuevos viriones (**Figura 1.7**).

Hasta mediados de los años ochenta se pensaba que la entrada del VIH en las células requería únicamente la condición de la unión del virus al receptor celular CD4. Posteriormente se demostró que miembros de la familia de los receptores de quimiocinas, principalmente CCR5 y CXCR4, son necesarios para el proceso de entrada del VIH en las células. La proteína encargada de realizar la **fusión** de la envuelta viral

conocida como gp160, está formada por dos glucoproteínas unidas de forma no covalente, gp120 o subunidad de superficie (SU) y gp41 o subunidad transmembrana (TM) que conforman la estructura tridimensional o trímeros en la superficie del virión.

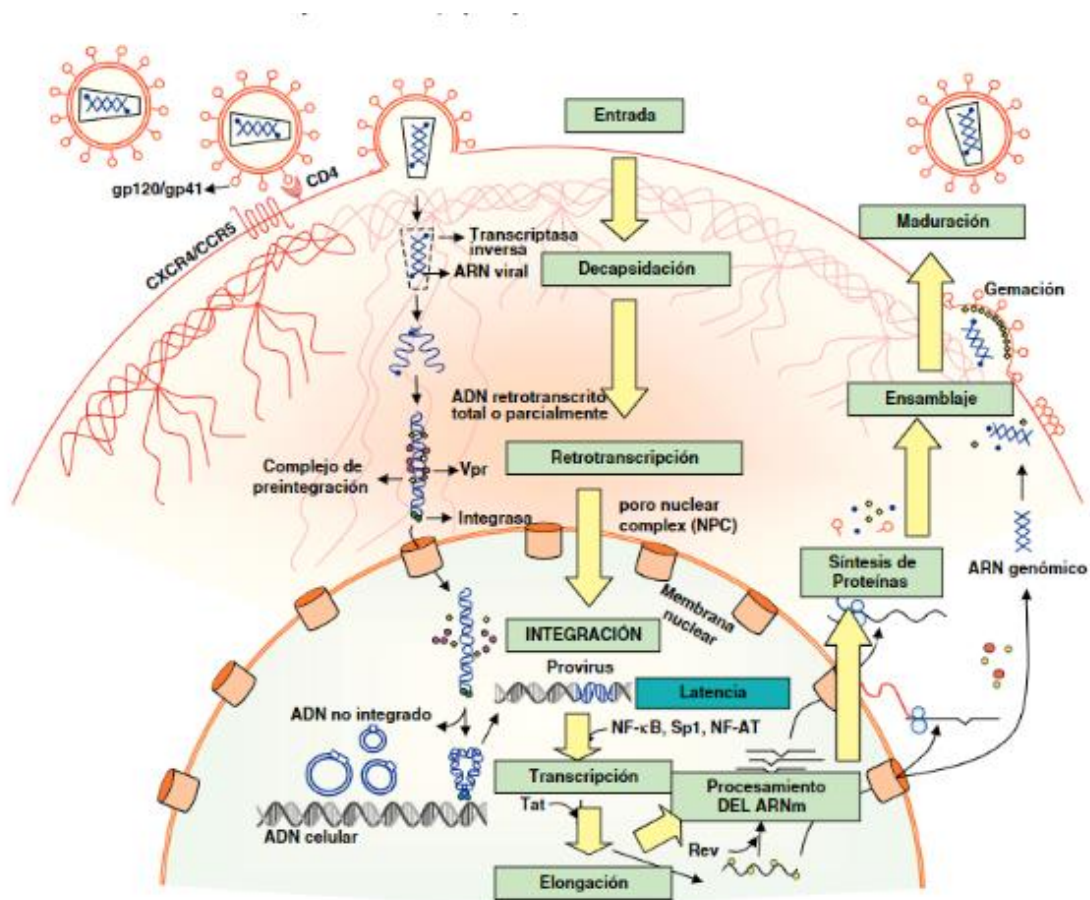


Figura 1.7 Ciclo biológico del VIH-1 (Alcamí & Coiras, 2011)

El proceso de entrada comienza cuando la interacción de gp120 se une al receptor celular CD4 que se expresa en la superficie de los linfocitos T, monocitos/macrófagos en los que tiene menor efecto citopático, células dendríticas y células microgliales del sistema nervioso central; esta unión específica promueve una nueva conformación permitiendo la interacción con los receptores de quimiocinas, CXCR4 o CCR5. La utilización de uno u otro receptor de quimiocina depende fundamentalmente de la secuencia de la región V3 y la posición que ocupan ciertos aminoácidos en las posiciones 11 y 25 como R o H que podrían determinar el tropismo X4 (Jensen & van 't Wout, 2003; Willey et al., 1994).

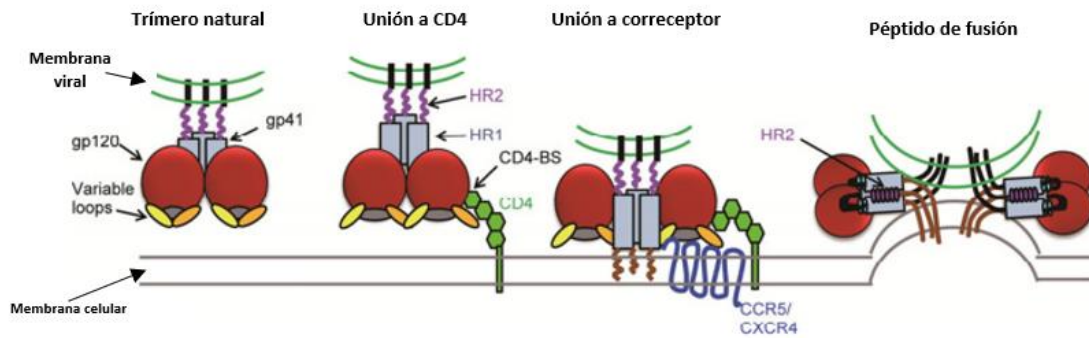


Figura 1.8 Representación de la entrada del VIH-1. Adaptado de (Kang et al., 2013)

Según el correceptor que use el virus para la entrada en la célula, los aislados de VIH-1 pueden ser clasificados como tropismo CCR5 (R5), CXCR4 (X4) o duales/mixtos (DM). El término dual/mixto engloba aislados virales que tienen verdaderamente tropismo dual, es decir, partículas virales con afinidad y capacidad de utilizar indistintamente ambos correceptores. De este modo, estas secuencias de cambios y la interacción con los receptores probablemente producen el anclaje a la membrana plasmática permitiendo finalmente la fusión de las membranas y la entrada del virus en la célula diana. Durante la primoinfección y en la fase crónica de la infección por el VIH se detectan únicamente variantes R5, mientras que en los estadios más avanzados de la enfermedad se observa la presencia de cepas X4 o duales R5X4, que se asocian con una mayor virulencia y una progresión más rápida a SIDA debido a la depleción de la población de linfocitos CD4 (Alcamí, 2008; Briz et al., 2006).

Una vez fusionadas las membranas viral y celular, se produce la **internalización de la nucleocápside** e inmediatamente la **decapsidación**. Se libera el genoma viral en el citosol junto con las enzimas virales (transcriptasa inversa, integrasa, proteasa) y las proteínas de la cápside. A continuación, se transcribe una de las hebras de ARN para la síntesis de ADN proviral (Alcamí & Coiras, 2011; Coiras et al., 2009). Esta fase puede constituir un período de latencia que se mantiene hasta que un estímulo externo provoca la activación de la fase tardía. La **retrotranscripción** es un proceso complejo que ocurre en el citosol comenzando con la generación de una hebra de ADN a partir de una de las dos hebras de ARN mediado por la enzima transcriptasa inversa. La segunda hebra de ADN se genera no sólo con la retrotranscriptasa, sino que requiere, además, la ribonucleasa H, que degrada parcialmente el molde de ARN original para generar así una doble cadena de ADN viral (Greene, 1991). Además, la proteína *Nef*, transportada por el propio virión aumenta de manera significativa la eficiencia de la retrotranscripción (Schwartz et al., 1995). Esta molécula de ADN bicatenaria forma un complejo de pre-integración con la enzima integrasa, factores virales, así como factores celulares que es

transportado al núcleo de la célula huésped y mediante la acción de la integrasa se integra en el genoma celular, constituyendo de esta manera la forma proviral del virus (Levy, 1993).

De media se integran 3-4 copias de **ADN proviral** en las células infectadas. Sin embargo, no todo el ADN transcrito se integra en el genoma de la célula hospedadora, sino que en el caso de linfocitos CD4 en reposo se mantiene en el citosol. Este ADN no integrado representa un 90% del ADN proviral existente en los linfocitos circulantes y además constituyen un potencial reservorio. Si finalmente no se produce la activación celular, el ADN no integrado se degrada por acción de las nucleasas celulares de 3 a 15 días después (Alcamí, 2008; Coiras et al., 2009; Lusic & Siliciano, 2017; Mirambeau, 2008). Una vez integrado, el VIH-1 puede seguir un comportamiento variable, ya que puede mantenerse en estado activo o latente, es decir, puede realizar tanto un ciclo lítico como todos los virus o un ciclo lisogénico estableciendo un reservorio viral capaz de mantenerse inactivo durante años.

El proceso de replicación comienza a partir del estado proviral del ADN. Este ADN proviral se **transcribe** a ARNm, proceso dependiente de factores celulares que interactúan con las secuencias reguladoras localizadas en las LTRs (Karn & Stoltzfus, 2012). Entre estos factores destaca una familia de proteínas implicadas en la regulación de múltiples expresiones génicas celulares que intervienen en el proceso de reconocimiento y activación inmunitarios; (NF-κB principal factor). La transcripción completa requiere de una correcta expresión genética que conlleva la transcripción de los genes reguladores *tat*, *rev* y *nef* (expresión temprana), estructurales y enzimáticos *gag*, *pol*, *env* y accesorios *vif*, *vpr* y *vpu* (expresión tardía) (Greene, 1991; Karn & Stoltzfus, 2012).

Una vez las **proteínas virales son sintetizadas** deben procesarse postraduccionalmente antes de ensamblarse y formar las partículas virales maduras. Entran en juego diferentes proteínas estructurales y accesorias entre las que destacan *Vif* y *Vpu*, pero principalmente la proteasa viral (PR), fundamental en la producción de las nuevas partículas virales maduras. El producto proteico del gen *Vif* influye en la infectividad del virus ya que su papel es interactuar con una proteína celular de la familia APOBEC. Dentro de esta familia, la proteína *APOBEC3G* (subfamilia *APOBEC3*) en ausencia de *Vif*, se une a los viriones y aumenta la tasa de error (gracias a su carácter mutagénico) de la transcriptasa inversa durante la retrotranscripción para sintetizar moléculas de ADN defectuosas que no puedan integrarse ni replicarse de manera efectiva (Mangeat et al., 2003; Marin et al., 2003; Sheehy et al., 2002).

La **proteasa** procesa los precursores *Gag* y *Gag-Pol* dando lugar a las proteínas de la cápside y nucleocápside (p6, p9, p17, p24) y a las enzimas estructurales (RT, proteasa e integrasa) respectivamente. Por el contrario, las proteínas de la envoltura codificadas por el gen *Env* son procesadas por una proteasa celular. En el momento final del ciclo infeccioso se produce el **ensamblaje de las proteínas virales** y la maduración de los nuevos viriones, durante el proceso de **gemación de los virus** a través de la membrana celular y permite constituir una partícula viral madura donde se recubre de la membrana lipídica de glucoproteínas de superficie adheridas a ella (Briggs & Kräusslich, 2011; Levy, 1993).

La **latencia** es un estado no productivo pero reversible que permite a las células de manera independiente volver a ser capaces de producir la infección debido al genoma viral que está integrado en el genoma celular. Se trata de un mecanismo que permite la persistencia viral, así como una escapatoria al sistema inmune y sus mecanismos de defensa (Bailey et al., 2004; T.-W. Chun et al., 1997; Sengupta & Siliciano, 2018). Es la principal barrera para la curación del VIH ya que el tratamiento antirretroviral (TAR) no es efectivo en las células en latencia y además éstas se vuelven indetectables para el reconocimiento inmune y por tanto no se pueden destruir. La erradicación del VIH-1 sin técnicas específicas contra el reservorio latente no parece posible. Por lo que la infección por VIH es intrínsecamente incurable a menos que se erradique los reservorios por completo ya que la suspensión del tratamiento antirretroviral conlleva al reinicio de la replicación del virus a expensas del reservorio viral (Grau-Expósito et al., 2019).

1.4.1 Parámetros virológicos e inmunológicos

Una vez el virus se introduce en el interior celular comienza una sucesión de eventos de carácter inmunológico, virológico y clínicos durante las primeras 4 a 8 semanas de la infección. A pesar de los síntomas desarrollados en la mayoría de los pacientes, muchos de ellos no desarrollan síntomas y pueden permanecer en período asintomático durante años. No obstante, son de igual manera pacientes con riesgo de transmisión del virus. Por otro lado, el grado de severidad del síndrome clínico es extremadamente variable y en algunos casos (inferior al 15%) requiere de la hospitalización del paciente. Por ello, en base a la evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos en el curso de la infección VIH distinguimos tres períodos: primoinfección, fase de replicación crónica y fase acelerada (**Figura 1.9**).

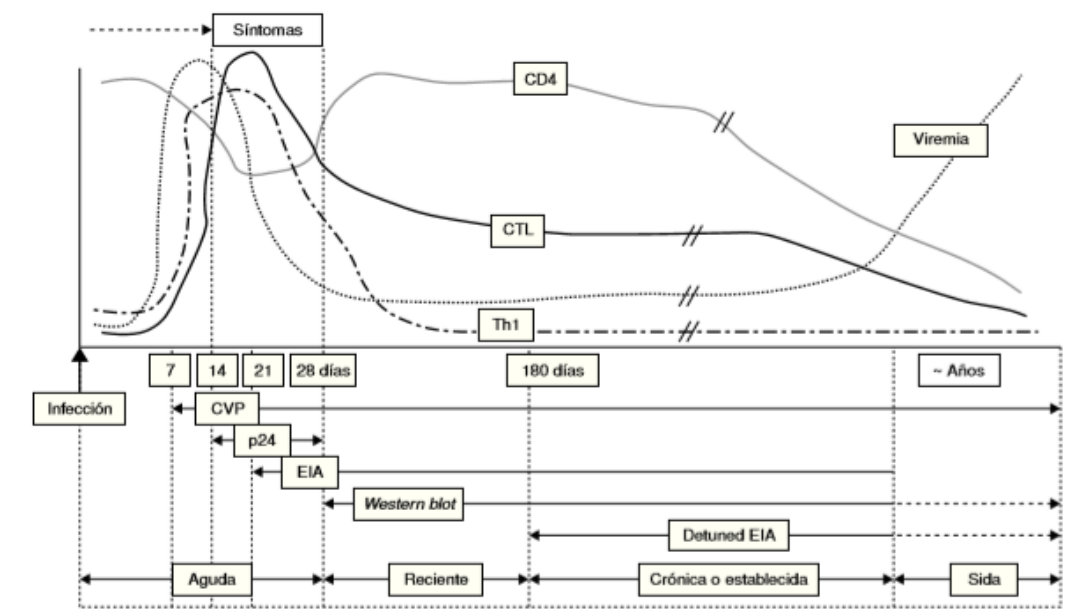


Figura 1.9 Esquema de la evolución clínica, inmunológica y vírica de la infección aguda, reciente y crónica por VIH-1 así como los marcadores serológicos de la infección (Miró et al., 2004).

La **primoinfección o infección aguda**, es la primera etapa de la infección por el VIH. En esta fase se produce la diseminación del virus a órganos linfoides. Es un período ventana de 2-4 semanas en las que no se han desarrollado anticuerpos específicos frente al virus. Al comienzo de la infección hay un aumento de la carga viral en plasma que coincide con un pico en el nivel de antígeno p24. Más tarde, la disminución de la carga viral y los niveles de antígeno p24 coinciden con el incremento de los niveles de anticuerpos. El virus se propaga con velocidad y provoca la destrucción de los linfocitos CD4 activados sobre todo en el sistema GALT (*Gut-Lymphoid Associated Tissue*); un sistema formado por las células dendríticas y linfocitos de la mucosa vaginal y rectal, ésta es la primera diana del VIH (Alcamí & Coiras, 2011) Además, el 50% de las personas infectadas pueden desarrollar manifestaciones clínicas sugestivas de un síndrome retroviral agudo (mononucleosis infecciosa). En esta etapa, los niveles del virus son muy elevados y los pacientes presentan tasas muy altas de transmisión debido a la alta carga viral presente en el plasma, por lo que en esta fase es especialmente importante realizar el cribado correctamente para la prevención del VIH. Además, se estima que casi la mitad de las infecciones causadas por el VIH se producen desde una persona con infección temprana (Cohen et al., 2011).

La **fase crónica o asintomática** de la infección corresponde a un período de respuesta humoral y celular durante años que reflejan la replicación viral crónica que sigue compitiendo con el sistema inmune y éste responde para controlar la enfermedad.

Además, la fase crónica del VIH corresponde a una fase asintomática que puede durar desde meses hasta más de 10 años en ausencia de TAR (González-Alba et al., 2011) (<https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>). La viremia desciende hasta llegar a niveles indetectables y los niveles de linfocitos CD4 permanecen relativamente estables, aunque con tendencia a descender progresivamente; a medio/largo plazo conllevará una incapacidad progresiva del sistema inmune para contener la replicación viral (Miró et al., 2004).

Esta incapacidad del sistema inmune debido a la caída en los niveles de linfocitos T CD4 lleva a la aparición del **estadio SIDA (fase acelerada)** coincidiendo con un incremento de la cantidad de virus y células infectadas circulantes. Se caracteriza por la aparición de infecciones oportunistas debido al continuo deterioro inmunológico (CD4+ <200/uL) que permite una replicación viral más agresiva y junto con sus mecanismos de diversidad y evasión inmune finalmente superarán la respuesta inmunológica y la capacidad de regeneración del sistema, por lo que éste será progresivamente destruido (<https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>). El recuento linfocitario de CD4+ nos permite determinar uno de los puntos más importantes en la evaluación de un paciente infectado por VIH, el estadio de la enfermedad. El sistema más utilizado es la clasificación de la CDC. Los pacientes son clasificados en 3 estadios en función de los niveles de CD4+: el estadio 1 corresponde a la infección primaria y a pacientes asintomáticos con o sin linfadenopatías generalizadas persistentes. El estadio 2 se aplica a los pacientes que presentan síntomas de enfermedades que no pertenecen al estadio 3 pero sí que tienen relación con el VIH. Por último, el estadio 3, incluye a los pacientes que presenten las patologías incluidas en las enfermedades de diagnóstico de SIDA (<https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>).

1.5 Diagnóstico y seguimiento de la infección por VIH

El diagnóstico del VIH se basa principalmente en la detección de anticuerpos en el suero o plasma del individuo. Para ello se usan pruebas de cribado o *screening* y posteriormente se confirman mediante pruebas más específicas. El diagnóstico se puede apoyar también en técnicas moleculares como la PCR o pruebas fenotípicas.

Actualmente, también se han popularizado las llamadas pruebas rápidas de diagnóstico capaces de dar un resultado en un breve período de tiempo. Todas estas pruebas pueden utilizarse para dar un diagnóstico, pero siempre hay que seguir un algoritmo diagnóstico que está optimizado para utilizar correctamente las técnicas y dar un correcto diagnóstico a los pacientes. Este algoritmo varía según el modo de trabajo de los sistemas de salud y del lugar geográfico; en los países en vías de desarrollo

normalmente se utiliza más un algoritmo basado en las pruebas rápidas que en las técnicas convencionales debido a la ausencia de unas instalaciones óptimas para su uso y en ocasiones del personal correctamente instruido para llevarlas a cabo.

1.5.1 Diagnóstico serológico

El diagnóstico de la infección por VIH se realiza mediante la serología, es decir, la búsqueda de anticuerpos específicos para el VIH-1 y el VIH-2 o la detección simultánea de anticuerpos VIH-1/VIH-2 y el antígeno p24 del VIH-1.

Los **tests serológicos** se clasifican en 2 tipos: inmunoensayos o técnicas de cribado y ensayos confirmatorios. Las **pruebas de screening o cribado** tienen una sensibilidad mayor que las pruebas de confirmación y detectan muestras reactivas para la diana que queremos detectar. Se clasifican según la base antigénica que utilizan para detectar la infección por VIH. Las primeras técnicas denominadas inmunoensayos de primera generación, utilizaban un lisado viral como antígeno con una sensibilidad relativa, pero carecían de especificidad. Estas pruebas detectan los antígenos a los 40 días de la infección (**Figura 1.10**).

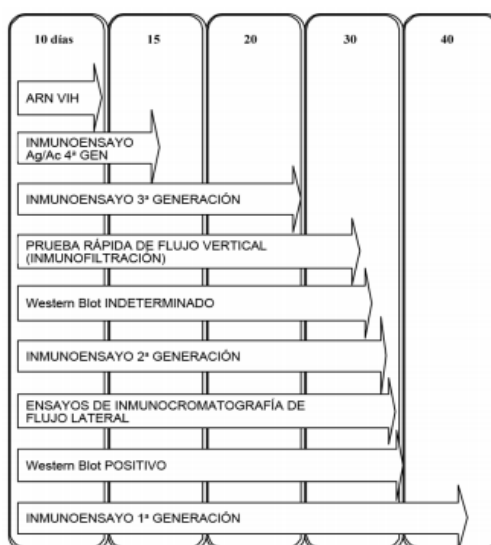


Figura 1.10 Desarrollo de las pruebas de screening. Días transcurridos hasta positivizar la infección por VIH-1 (Aguilera Guirao A et al., 2014)

Más adelante los ensayos de segunda generación acortaron los tiempos de detección de anticuerpos a los 33-35 días después de la infección; se basaban en la detección de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos frente al grupo M, N, O del VIH-1 y frente al VIH-2. Los de tercera generación o tipo sándwich fueron más innovadores detectando los anticuerpos IgM e IgG, además de acortar el período ventana a 20-25 días. Los más novedosos y de uso en la actualidad de forma generalizada, son las técnicas de cuarta generación, capaces de detectar de manera simultánea anticuerpos frente al VIH-1 y

VIH-2 así como el antígeno p24 del VIH-1 y reduciendo el tiempo de detección a 13-15 días (Aguilera Guirao A et al., 2014).

Los **tests confirmatorios** tienen una especificidad superior para poder corroborar los resultados del screening. Los más usados actualmente son el *Western Blot* (WB) y los inmunoensayos en línea (LIA). También son más caros que las pruebas de *screening*. La interpretación de los resultados de los ensayos confirmatorios es complicada, por ejemplo, la ausencia de bandas se interpreta como un resultado negativo, pero para la valoración de los resultados positivos hay distintos criterios según los criterios establecidos por distintas organizaciones. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera un resultado positivo cuando hay al menos dos bandas de glicoproteínas, en cambio los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos bandas de p24, gp41, y gp160/gp120 (Aguilera Guirao A et al., 2014).

En algunos casos, se puede obtener un **resultado indeterminado** debido a distintas causas: infección aguda o estadio muy avanzado de la enfermedad, recién nacidos de madre seropositiva, sueros inactivados por calor, reacciones cruzadas con otros retrovirus y otras causas. Por este motivo, puede realizarse de nuevo la prueba con una nueva muestra o determinar la carga viral, una prueba conveniente para salir de dudas acerca del diagnóstico del paciente ya que podría estar en la fase de infección aguda. Cuando se detecta un inmunoensayo positivo con un test confirmatorio negativo o indeterminado y una prueba virológica (ARN-VIH o antígeno p24) positiva o con un inmunoensayo negativo se cataloga de infección aguda.

Las **pruebas rápidas de diagnóstico** son técnicas de rápida ejecución capaces de proporcionar un resultado en 30 minutos con lectura visual más subjetiva. No requieren maquinaria compleja, ni una instalación determinada. Se trata de una prueba de bajo coste, rápida y muy sencilla en comparación con las técnicas convencionales. Sin embargo, los resultados no son definitivos sino preliminares ya que si una muestra es positiva deberá comprobarse en un laboratorio mediante una prueba de diagnóstico convencional. Las características de las pruebas rápidas las hacen idóneas para los países de recursos limitados donde las infraestructuras sanitarias son escasas, proporcionando de esta manera una alternativa para el diagnóstico preliminar de la infección por VIH. También se utilizan en entornos no clínicos comunitarios, farmacias y laboratorios con un bajo volumen de muestras. La OMS recomienda el uso de estas pruebas rápidas sobre todo en países en vías de desarrollo debido a la sencillez de uso, así como su facilidad de almacenamiento, conservación y transporte. Estas pruebas se pueden realizar en fluido oral o en sangre capilar recogida por mediante una punción

digital y no requieren punción venosa, aunque también se pueden hacer en muestras de suero o plasma. Las pruebas rápidas pueden ser de dos tipos: inmunoadherencia inmunocromatográfica (flujo lateral) y de inmunoadherencia por inmunofiltración o inmunocentración. Los antígenos empleados son parecidos a los inmunoensayos y al igual que éstos, hay diferentes generaciones de pruebas rápidas según su capacidad de detectar la presencia de anticuerpos VIH-1, VIH-2 y/o el antígeno p24 del VIH-1. A pesar de ser pruebas de lectura subjetiva ya que la interpretación puede generar dudas en los resultados, tienen una especificidad y sensibilidad alta, aunque inferior a la de los inmunoensayos convencionales; incluso las de cuarta generación por lo que pueden dar lugar a falsos negativos. Por eso, en los países en vías de desarrollo se recomienda el uso de un algoritmo donde se utilicen varias pruebas de diagnóstico rápido y una prueba confirmatoria de la infección por VIH.

1.5.2 Carga viral

La carga viral (CV) es la herramienta de laboratorio recomendada para la monitorización del tratamiento antirretroviral y para tomar decisiones respecto a cambios en la pauta terapéutica del mismo ya que es el mejor marcador de respuesta al TAR. Niveles detectables de viremia pueden indicar la presencia de mutaciones de resistencia, fallos en la adherencia o un mal control de la infección. Los acontecimientos recientes han potenciado los esfuerzos para aumentar el acceso a la supervisión rutinaria de la carga viral, sobre todo en los países en vías de desarrollo. Concretamente, las directrices consolidadas de la Organización Mundial de la Salud de 2016 recomiendan el seguimiento exhaustivo de la carga viral para los pacientes bajo TAR para confirmar en el caso de que lo hubiera, fracaso terapéutico (World Health Organization, 2021) y los ambiciosos objetivos de ONUSIDA 95-95-95 para 2030 exigen una tasa de supresión de la carga viral del 95% entre los pacientes en tratamiento antirretroviral (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS, 2014).

Actualmente existen diversas técnicas para la cuantificación de la carga viral que tan solo difieren en sus formatos, tiempos y capacidad de procesamiento. Emplean la PCR en tiempo real consiguiendo altos niveles de sensibilidad analítica, reproducibilidad y linealidad. Todas ellas incorporan métodos automatizados de extracción de ARN, reduciendo el tiempo de procesamiento, la variabilidad, el riesgo de contaminación y tienen la capacidad de procesar un elevado número de muestras. El límite de detección varía según la técnica, pero tienen un amplio rango dinámico entre las 20-100 copias/ml y detectan la carga viral en todos los subtipos B y no-B del VIH-1 grupo M, algunas el VIH-1 grupo O, pero no detectan la carga viral de los pacientes infectados por el VIH-2.

Según los estudios, se recomienda la monitorización de la CV de un paciente siempre con el mismo sistema por la variabilidad entre las técnicas, sobre todo cuando se cuantifican subtipos no-B. En algunas ocasiones se ha utilizado la CV como apoyo al diagnóstico de la infección aguda por VIH según lo anteriormente comentado (World Health Organization, 2021).

En el caso de las transmisiones madre-hijo durante el embarazo sí que se puede utilizar la determinación de la CV como prueba de diagnóstico del VIH para recién nacidos de madres infectadas. Esto se debe a que el paso de los anticuerpos maternos al hijo puede llevar a resultados falsos positivos en las pruebas serológicas. En este caso solo serán válidos aquellos resultados cuyo nivel de viremia sea superior a 5.000 copias/ml y se realiza un seguimiento del recién nacido de hasta 6 meses para descartar la infección, siempre y cuando no se le haya dado lactancia materna (Aguilera Guirao A et al., 2014).

1.5.3 Seguimiento inmunológico: linfocitos T CD4+

El estado inmunológico del paciente durante la infección de VIH puede ir variando en función de varios factores, como el paciente mismo, la carga viral, el tratamiento antirretroviral o la adherencia al TAR. El recuento de células linfocitarias T CD4 + predice la progresión de la enfermedad, así como la supervivencia de los pacientes VIH positivos. Se realiza el recuento tras el diagnóstico de la infección para determinar si es necesario hacer profilaxis de infecciones oportunistas y evaluar el riesgo de comorbilidades (Aberg et al., 2014). Desde 2015 se recomienda empezar el tratamiento antirretroviral en adultos cuanto antes, una vez diagnosticado la infección por VIH independientemente de los niveles de CD4 o estadio clínico (Brazier et al., 2019; World Health Organization, 2015); una vez que se ha empezado el tratamiento, el recuento linfocitario se utiliza para valorar el estado inmunológico del paciente así como la monitorización de la carga viral para la evaluación del tratamiento (World Health Organization, 2019). El incremento de 50 a 100 linfocitos CD4+/mm³ durante el primer año de tratamiento indica una buena respuesta al tratamiento antirretroviral. En los tres primeros meses se recupera el mayor número de estas células. Posteriormente, en los siguientes años de tratamiento, los niveles de linfocitos van aumentando entre 50-100 células/mm³ hasta que alcanzan un nivel en el que se mantiene estable dicho recuento. Se recomienda realizar el seguimiento mediante el recuento linfocitario CD4+ a todos los pacientes que estén bajo tratamiento antirretroviral cada tres meses para valorar la reconstitución del sistema inmune. En aquellos pacientes que están en supresión viral y con una buena reconstitución inmunológica de 300-500 linfocitos CD4+/mm³ durante

al menos dos años, el recuento de CD4+ proporciona poca información adicional por lo que se recomienda monitorizar a estos pacientes de manera anual; y en pacientes con niveles superiores a 500 CD4+/mm³ durante al menos dos años, la monitorización inmunológica podría ser algo opcional. Sin embargo, en el caso de haber cambios en el estado clínico del paciente como la aparición de infecciones oportunistas o síntomas asociados al VIH, así como cambios en el tratamiento antirretroviral capaces de provocar un descenso en el nivel de los linfocitos CD4+, se recomienda hacer un seguimiento más frecuente (Arribas Rosa Polo & Martínez Juan González García, 2020; Caniglia et al., 2016; Ford et al., 2015).

Hay factores que afectan directamente al nivel de linfocitos CD4+, como algunos fármacos que inhiben la función de la médula ósea o la presencia de infecciones agudas ya que pueden afectar al recuento total de leucocitos y porcentajes de linfocitos. Esto es importante ya que el recuento linfocitario se calcula según el total de las células y los linfocitos totales. En África Sub-Sahariana, varios estudios han descrito la presencia de leucopenia racial en la población de esta región (Ngowi et al., 2009).

1.6 Tratamiento de la infección VIH y resistencia a antirretrovirales

El tratamiento antirretroviral (TAR) ha cambiado la historia natural de la infección VIH, al impedir la evolución natural de la enfermedad y prolongando la esperanza de vida de los individuos infectados que puede alcanzar edades similares a los no infectados.

El principal objetivo del tratamiento antirretroviral es evitar la replicación del virus y reducir la carga viral hasta llegar a niveles indetectables, ya que aún no se ha conseguido la cura total de la infección. Se ha demostrado que el inicio TAR se asocia con un menor riesgo de transmisión y una reducción del riesgo de adquirir nuevas infecciones (Cohen et al., 2016).

No fue hasta 1987 cuando se aprobó el primer fármaco para el tratamiento de VIH en el mundo, la zidovudina o azidotimidina (ZDV o AZT) el primer inhibidor de transcriptasa inversa análogo de nucleósido o ITIAN. Más adelante a comienzos de los 90, se aprobaron otros dos fármacos para el TAR, la didanosina (ddI) y zalcitabina (ddC) permitiendo el inicio de la biterapia (Arts & Hazuda, 2012; Jordan et al., 2002). Hasta 1995 la **monoterapia o biterapia** eran los únicos tratamientos accesibles, pero ese mismo año se produjo la aprobación del primer inhibidor de proteasa (IP), el saquinavir seguido de un inhibidor de la RT no análogo de nucleósido o ITINAN, la nevirapina (NVP), en 1996; provocó un cambio global en la estrategia terapéutica del VIH,

originando un tratamiento combinado de **tres fármacos o más de un mínimo de 2 familias** farmacológicas distintas coadministrados a la vez, conocido como tratamiento antirretroviral de gran actividad o **TARGA**, pero conocido globalmente como **HAART** (*High Activity Antiretroviral Therapy*) en inglés. La administración simultánea de varios fármacos produce una barrera genética, farmacocinética y farmacodinámica que dificulta al VIH-1 desarrollar resistencias a los ARVs (Drusano et al., 1998). El tratamiento debe empezarse lo antes posible en todos los pacientes diagnosticados con infección por VIH-1 con o sin sintomatología e independientemente del número de linfocitos T CD4+ o estadio clínico (Lundgren et al., 2015; S. Sharma et al., 2019; World Health Organization, 2021).

Antes de comenzar un tratamiento se recomienda realizar un estudio de resistencias, determinar los niveles de CD4 y carga viral plasmática a aquellos pacientes que no han recibido tratamiento anteriormente, así como a aquellos que están en fallo virológico y deben realizar cambios en su pauta terapéutica (Arribas Rosa Polo & Martínez Juan González García, 2020).

Se recomienda comenzar con el tratamiento justo después del diagnóstico, incluso inmediatamente después del diagnóstico a menos que el paciente no esté preparado para ello. Además, debe prepararse al paciente, proporcionándole información sobre los objetivos del tratamiento y las distintas opciones, seleccionando la pauta terapéutica que mejor se adapte a su estilo de vida, comorbilidades, posibles interacciones, y valorando el riesgo de una mala adherencia (Arribas Rosa Polo & Martínez Juan González García, 2020). Si no es posible comenzar de inmediato, al menos debe ser, máximo, en dos semanas desde que se diagnosticó la infección. En el caso de los pacientes con infecciones oportunistas, el comienzo inmediato del tratamiento controvertido ya que los datos son limitados. Sin embargo, en general habría una menor progresión de la enfermedad en aquellos pacientes que inician el TAR de forma precoz (antes de los 15 días) (Arribas Rosa Polo & Martínez Juan González García, 2020; Saag et al., 2018).

Por otro lado, el TARGA también es utilizado como tratamiento para la infección de VIH-2 bajo las pautas del VIH-1 pero con ciertas modificaciones. Debido a las diferencias genéticas entre estos dos tipos de VIH, el VIH-2 es tiene una resistencia natural a los inhibidores de transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos y disminuye la eficacia de los IPs e inhibidores de fusión como son la enfuvirtida y el maraviroc (Ribera et al., 2011).

Las pautas terapéuticas recomendadas global y actualmente para el TAR inicial de la infección por VIH-1 se basan en la combinación de 2, 3 o más fármacos. La pauta triple debe incluir al menos 2 ITIANs asociados a un ITINAN, un inhibidor de proteasa (IP) o un inhibidor de integrasa (INI). En el caso de pautas dobles, a día de hoy solo hay una pauta inicial recomendada, formada por un ITIAN (3TC) y un INI (DTG). Estas pautas están dirigidas a la mayoría de los pacientes, sin embargo, cada tratamiento debe ser valorado de forma individual; ya que las mujeres embarazadas no han de seguir estas pautas, así como los pacientes coinfectados por otras infecciones (p. ej. tuberculosis) (Arribas Rosa Polo & Martínez Juan González García, 2020).

1.6.1 Fármacos antirretrovirales

Los fármacos actuales que se pueden utilizar para el tratamiento del VIH-1 se clasifican en varias clases. Las cuatro clases principales son: los inhibidores de la transcriptasa inversa (ITIAN, ITINAN) que actúan como terminadores de la cadena en la transcripción inversa de ARN a ADN; los inhibidores de la proteasa (IP), enzima implicada en la maduración de las partículas víricas que se produce por el corte en las proteínas precursoras y los inhibidores de integrasa (INI) e inhibidores de la entrada y la fusión (Phanuphak & Gulick, 2020). En la **Tabla 1.4** podemos encontrar los fármacos antirretrovirales autorizados para tratar la infección por VIH.

Tabla 1.4 Fármacos antirretrovirales para la infección VIH.

INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA			
NOMBRE	Abreviatura	Año de autorización	Comentarios
AZIDOTIMIDINA O ZIDOVUDINA	AZT, ZDV	1987	Sintetizada en 1964 como agente antineoplásico. Inhibe VIH-1 y VIH-2 (Rai et al., 2018).
DIDANOSINA	ddl	1991	Usado como monoterapia en pacientes intolerantes o con fallo de tratamiento a la AZT (Pollard, 2000)
ESTAVUDINA	dd4	1994	Combinación con AZT contraindicada. Bajo uso debido a sus efectos adversos (Rai et al., 2018).
LAMIVUDINA	3TC	1995	Posee un potente efecto inhibidor frente al VHB. Asociado con rápida y alto nivel de mutaciones de resistencia (Perry et al., 1997).
ABACAVIR	ABC	1998	Presenta actividad antirretroviral frente al VHB y el VIH-2. Recomendado en muchos países como ARV de 1ª línea (Ann et al., 2017; Foster & Faulds, 1998)
TENOFOVIR	TDF	2001	Alta actividad frente cepas del VIH resistentes a otros ITIANs. Uso en tratamientos de inicio y de rescate (Fung et al., 2002; Masho et al., 2007).
ADEFOVIR	ADV	2002	Desuso. Alta toxicidad renal. Actividad contra el VIH-1, VHB in vivo, herpesvirus (Fisher et al., 2001)
EMTRICITABINA	FTC	2003	Similar a la 3TC, pero con actividad 5-10 veces superior. Actividad frente a VIH-2, VHB, SIV y virus de la inmunodeficiencia felina (Al-Majed et al., 2020).
TENOFOVIR ALAFENAMIDA	TAF	2015	Variante del TDF. Menores efectos secundarios (de Clercq, 2016).
NEVIRAPINA	NVP	1996	Primer ITINAN desarrollado. 1ª generación de ITINANs. Baja barrera genética (Hirsch et al., 2008).
EFAVIRENZ	EFV	1998	1ª generación de ITINANs. Baja barrera genética. Usado en pacientes con infecciones oportunistas (Burgos et al., 2018).
ETRAVIRINA	ETV	2008	2ª generación de ITINANs. Alta barrera genética (Al-Majed et al., 2020; Ghosn et al., 2010).
RILPIVIRINA	RPV	2011	2ª generación de ITINANs. Alta barrera genética (Ghosn et al., 2010).
DORAVIRINA	DOR	2018	Indicado para pacientes naïve y pacientes que deseen cambiar TAR con una supresión viral estable. En Europa recomendado como tratamiento inicial (Colombier & Molina, 2018; Jeremy Lerner & Badowski, 2020).

INHIBIDORES DE LA PROTEASA			
SAQUINAVIR	SQV	1995	1er IP desarrollado. Hizo posible el uso de la terapia combinada en el tratamiento del VIH (Kitchen et al., 1995).
INDINAVIR	IDV	1996	Posología complicada. Resistencias cruzadas con otros IPs (Wensing et al., 2010).
RITONAVIR	RTV, r	1996	Potenciador de otros IPs en dosis bajas para aumento de su eficacia antiviral. Contraindicado con otros IPs que compartan la ruta metabólica del CYP450 como el NFV (Fernando Bernal, 2016)
NELFINAVIR	NFV	1997	1er ITINAN para tratamiento pediátrico (Tang & Shafer, 2012).
AMPRENAVIR	APV	1999	Forma activa del FSV. Alto porcentaje de pacientes abandonaban el uso de amprenavir, por dificultades para tragar ocho cápsulas muy grandes dos veces

			al día. Siempre usado en combinación con RTV (Arvieux & Tribut, 2005; Wensing et al., 2010)
LOPINAVER	LPR	1999	1 ^{er} IP potenciado con RTV (Wensing et al., 2010)
ATAZANAVER	ATV	2003	Bien tolerado. Recomendado para terapia inicial. Contraindicado en pacientes tratados por resistencias cruzadas (Rhee et al., 2010).
FOSAMPRENAVER	FSV	2003	Precursor del amprenavir. Mejoraba las concentraciones plasmáticas y una menor carga de píldoras. Siempre usado en combinación con RTV (Arvieux & Tribut, 2005).
TIPRANAVER	TPV	2005	Indicado solo en pacientes con fallo terapéutico previo. Uso limitado (Ribera et al., 2011).
DARUNAVER	DRV	2006	IP con mayor barrera genética. Se usa potenciado con RTV (Carey et al., 2010)
COBICISTAT	COBI, c	2014	Potenciador de eficacia antiviral. Menor efecto potenciador que RTV (Deeks, 2014a).

INHIBIDORES DE LA INTEGRASA			
RALTEGRAVIR	RLG	2007	1 ^{er} INI aprobado para pacientes en fallo terapéutico y multirresistentes a otros ARVs (ITIANs, ITINANs e IPs). Actividad frente al VIH-2, tropismo X5, R5 y dual. Alta barrera genética (Nguyen et al., 2011).
DOLUTEGRAVIR	DTG	2013	INI de 2 ^a generación. Mayor barrera genética entre todos los INIs, baja toxicidad y simple posología (Rathbun et al., 2014)
ELVITEGRAVIR	ELV	2014	INI de 1 ^a generación. Baja barrera genética. Uso potenciado con cobicistat (Deeks, 2014b). Resistencias cruzadas con RAL (Shimura & Kodama, 2009)
BICTEGRAVIR	BIC	2018	Alta barrera genética. Indicado para pacientes naïve y en supresión viral con TAR de al menos 3 meses y sin ningún fallo virológico previo o mutaciones de resistencias (Hill et al., 2018).
INHIBIDORES DE LA FUSIÓN Y ENTRADA			
ENFUVERTIDA	T-20	2003	1 ^{er} inhibidor de la entrada aprobado. Específico de VIH-1, actividad nula frente a VIH-2. Baja barrera genética (Fernando Bernal, 2016; Ribera et al., 2011).
MARAVIROC	MV	2007	1 ^{er} inhibidor de entrada de CCR5. Necesaria una prueba de tropismo previo a su uso (Gutiérrez et al., 2011)
IBALIZUMAB	IBA	2018	Unión no competitiva al receptor CD4. Utilizado en terapias de rescate (Emu et al., 2018; Markham, 2018).
NUEVOS FÁRMACOS			
FOSTEMSAVIR	FTR	2020	Bloquea gp120. Sin resistencias cruzadas en estudios <i>in vitro</i> (Kozal et al., 2020)
CABOTEGRAVIR	CAB	2021	Tratamiento inyectable mensual, siempre en combinación con RPV en pacientes sin evidencia actual o previa de resistencia y sin fracaso virológico previo con ITINANs e INIs (Swindells et al., 2020; Thornhill & Orkin, 2021; Trezza et al., 2015)
ISLATRAVIR	EFdA	<i>Pendiente</i>	Posible uso en TAR de administración semanal, mensual o una dosis de liberación mediante implante. En fase de investigación (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04003103)

1.6.2 Tratamiento en África Sub-Sahariana

Casi todos los países de África Sub-Sahariana han adoptado políticas nacionales para tratar a todas las personas con VIH, independientemente del recuento de células CD4 o la etapa clínica. El TARGA, disponible en los países desarrollados desde 1995, tardó en torno a 10 años en llegar a las zonas del mundo más afectadas por el VIH, como ASS. Sin embargo, al principio solo se trataba a pacientes con una avanzada inmunodeficiencia por VIH y con mayor riesgo de muerte. En 2015, ampliaron sus pautas de tratamiento para incluir a todas las personas con VIH en el TAR independientemente de su estadio clínico o recuento linfocitario de acuerdo a las recomendaciones de la OMS (World Health Organization, 2015). Con estas medidas aprobadas, las tendencias en la incidencia y las muertes por VIH han mejorado sustancialmente en ASS (Hamers et al., 2011; Nash et al., 2018).

En ASS, el régimen más frecuente se basa en 2 ITIANs + 1 ITINAN, pero a medida que se han ido desarrollando nuevos fármacos con una barrera genética superior, las combinaciones de los regímenes se han modificado. Actualmente, se recomienda el **DTG en combinación con dos ITIANs** principalmente en adultos y adolescentes como régimen de primera línea siguiendo los protocolos la OMS (World Health Organization, 2019) apoyados por el Plan de Emergencia del Presidente de los E.E.U.U. para el SIDA (PEPFAR) (PEPFAR, 2019) y el Plan Nacional del VIH/SIDA de RDC (PNMLS, 2018).

Otros regímenes alternativos emplean **un ITINAN (EFV) en dosis bajas en combinación con dos ITIANs**, en adolescentes y adultos o **un inhibidor de proteasa potenciado y administrado en combinación con dos ITIANs** (Arribas Rosa Polo & Martínez Juan González García, 2020; World Health Organization, 2019).

Diversos estudios realizados evaluando el impacto positivo del TAR en los recuentos de células CD4 en ASS, como Sudáfrica, Uganda, Tanzania, Ruanda y Malawi han demostrado que dio como resultado, una disminución significativa de la mortalidad y un aumento de la esperanza de vida de 10 años (Bor et al., 2013; Marston et al., 2012; Mills et al., 2011; Mossong et al., 2013; Nsanzimana et al., 2015; Reniers et al., 2014).

En la RDC se estima que, en el año 2020, vivían 510 000 (430 000 – 580 000) personas con VIH, de las cuáles el 61% eran mujeres mayores de 15 años y el 23% hombres mayores de 15 años. Gracias a la ampliación del TAR y los programas nacionales frente al VIH se han conseguido disminuir la mortalidad en un 60% desde 2010 así como una disminución en nuevas infecciones en un 50% (<https://aidsinfo.unaids.org/>). Sin embargo, las dificultades para llevar el tratamiento a todas las personas con VIH siguen siendo un desafío, ya que en 2020 solamente había

un 75% de personas VIH+ (380.000 personas) en tratamiento en todo el país (<https://aidsinfo.unaids.org/>) (UNAIDS, 2021). Las dificultades son varias, culturales, geográficas, políticas y sanitarias entre otras. A medida que el TAR avanza son necesarios esfuerzos encaminados a simplificar tanto la toma como el envío de muestras a laboratorios de referencia para realizar técnicas de diagnóstico serológico y genético, análisis de carga viral y resistencia a fármacos antirretrovirales en países con recursos limitados (Ditekemena et al., 2014).

1.6.3 Fracaso Viroológico

Se define el fracaso virológico como una replicación viral con un control inadecuado. Se determina mediante la cuantificación de la carga viral: si la CV plasmática es detectable 24 semanas después de haber comenzado el TAR o si tras alcanzar la CV indetectable, ésta vuelve a ser superior a 50 cp/mL en determinaciones consecutivas separadas por 2-4 semanas (Arribas Rosa Polo & Martínez Juan González García, 2020).

Entran en juego diferentes factores que han de ser considerados para determinar la causa del fracaso virológico: la falta de adherencia al tratamiento, errores en la dosificación, interacciones con otros fármacos o alimentos, potencia farmacológica limitada, problemas en la absorción o desarrollo de mutaciones de resistencia frente a los antirretrovirales (J. Gregson et al., 2016; Gupta et al., 2009).

Por otro lado, encontramos pacientes con carga viral suprimida que ocasionalmente sufren episodios aislados y transitorios de viremias de bajo nivel, se conocen como *blips*. Estas viremias no superan las 500 cp/mL y su nivel desciende de nuevo de manera esporádica a 50 cp/mL sin ningún cambio en el TAR. Las causas de estos episodios se atribuyen a la propia replicación del VIH-1 en reservorios, fluctuaciones biológicas o errores en el procesamiento, las cuales no suelen tener relevancia clínica por lo que no se modifica el TAR. Sin embargo, algunos autores indican que la aparición de los *blips* de forma persistente está asociada a un mayor riesgo de tener un fracaso virológico (Aguilera Guirao A et al., 2014).

Por eso la monitorización de la carga viral es clave para detectar de forma oportuna el fracaso, ya que la prolongada exposición a un TAR fallido junto con la viremia en un nivel inadecuado pueden conducir al desarrollo de mutaciones de resistencias a los antirretrovirales junto con el aumento de la tasa de mortalidad e inmunodepresión (H. M. Chun et al., 2017).

En los países en vías de desarrollo la monitorización de la carga viral es limitada, por ello, en estos países, como la RDC, es necesario la ampliación de este recurso para preservar las opciones de segunda línea de tratamiento, evitando en la medida de lo posible el desarrollo de resistencias, así como reducir las tasas de mortalidad. Por ello, una de las alternativas propuestas son las muestras de sangre seca (*Dried Blood Spots*, DBS), una forma de reducir costes y simplificar la recogida de muestras para facilitar la monitorización viral, que conllevará a una mejora en el TAR (Phillips et al., 2015).

1.6.4 Adherencia al tratamiento antirretroviral

La adherencia es la capacidad o grado del paciente a comprometerse de elegir, iniciar y mantener el tratamiento antirretroviral, para conseguir la supresión viral mantenida en el tiempo. Una adherencia inadecuada es la primera causa de fracaso terapéutico. Por el contrario, una buena adherencia significa una reducción en la mortalidad, morbilidad, supresión de la carga viral y reducción de la transmisión del virus (Hines et al., 2019).

Los factores que afectan a una adherencia inadecuada son varios, por ejemplo: una pobre relación médico-paciente, consumo de drogas de manera activa, deterioro neurocognitivo, bajo nivel educativo, barrera idiomática, falta de apoyo social, polifarmacia, complejidad terapéutica (una dosis o varios) y efectos secundarios del tratamiento entre otros. Por el contrario, el apoyo emocional, incluir la medicación en las actividades de la vida diaria y la comprensión de la importancia del cumplimiento terapéutico son factores que predicen una adherencia correcta. Previamente a comenzar el tratamiento, hay que preparar al paciente para su cumplimiento, identificar cuáles pueden ser las complicaciones para tener una buena adherencia y corregirlas. Una vez comenzado, hay varios métodos para realizar un seguimiento periódico de la adherencia de los pacientes: entrevistas con el médico, controles en la dispensación de la farmacia, cuestionarios y recuento de la medicación sobrante. Los niveles subterapéuticos de los antirretrovirales conllevan a desarrollar resistencias a estos mismos, una omisión de una dosis del TAR tiene menor impacto que su interrupción durante un período de tiempo; por eso el TAR una vez iniciado debe continuar de manera indefinida (Arribas Rosa Polo & Martínez Juan González García, 2020). Las estrategias para mejorar la adherencia de los pacientes son muy diversas, desde el envío de mensajes recordatorios al móvil como terapias cognitivas y la educación entre otros. Actualmente, las pautas son más permisivas con un cumplimiento subóptimo, debido a que los fármacos actuales tienen mayor resistencia frente al desarrollo de resistencia gracias a su alta barrera genética (IPs e INIs).

1.6.5 Resistencias al tratamiento antirretroviral (TAR)

Las mutaciones de resistencia a los antirretrovirales se desarrollan en la diana de los mismos, y, casi sin excepción, disminuyen la eficacia de la replicación viral. Dichas resistencias pueden producirse por la presión de selección de fármacos (resistencias adquiridas) o mediante la transmisión de cepas resistentes (resistencias transmitidas) (Tang & Shafer, 2012). Las terapias supresivas de alto nivel usadas desde el comienzo del TAR evitan o provocan una reducción drástica en la velocidad de aparición de las variantes resistentes resultado de la baja actividad vírica que se traduce en una baja mutabilidad. Sin embargo, los niveles subterapéuticos en los pacientes no inhiben correctamente la replicación viral, provocando que se sigan produciendo variantes con la posibilidad de que acumulen en un único genoma aquellas mutaciones que confieran conjuntamente capacidad de resistencia y alto nivel de replicación. No hay resistencias cruzadas entre las diferentes clases de antirretrovirales, o incluso los virus con altos niveles de resistencia a fármacos de una clase de ARV son totalmente susceptibles a los ARVs de otra clase previamente no utilizada. Sin embargo, la resistencia cruzada en una misma clase es común ya que las mutaciones de resistencias reducen la susceptibilidad de múltiples fármacos de la misma clase (Melikian et al., 2014; Rhee et al., 2010; Tang & Shafer, 2012)

Hablamos de una **baja barrera genética** cuando una única mutación es suficiente para desarrollar resistencia; y de **alta barrera genética** cuando se requieren la acumulación de varias mutaciones para adquirir resistencia.

Las **mutaciones primarias o principales** son aquellas que afectan directamente a la susceptibilidad del virus frente a los antirretrovirales, provocando una disminución de ésta. Estas mutaciones, aparecen en la zona clave de la enzima, en su centro catalítico. Alteran la unión de la enzima con su diana, provocando que se necesite un incremento de antirretroviral para inhibir la enzima (Rosa Flieller et al., 2019). Las **mutaciones secundarias** son aquellas que se encuentran en los codones que codifican fuera del sitio activo de la enzima. Surgen de manera más tardía, comúnmente se observan cuando ya han aparecido una o más mutaciones primarias, para compensar la pérdida de eficacia biológica del virus por las mutaciones primarias (Vanegas-otálvaro et al., 2014). Por otro lado, cabe señalar la posible aparición de **mutaciones accesorias**, que solo reducen la susceptibilidad en combinación con otras mutaciones principales o aumentan la capacidad replicativa de virus que tienen importantes mutaciones de resistencia a los ARVs. Por último, los **polimorfismos**, son mutaciones naturales de la

secuencia del ARN que afectan a los codones, cambiando un aminoácido por el mutado sin afectar a la resistencia a los ARVs (https://hivdb.stanford.edu/pages/FAQ/FAQ_answers.html).

1.6.5.1 Resistencia a inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

Las resistencias desarrolladas frente a los ITIANs se producen debido a dos mecanismos moleculares: la escisión fosforilítica y las mutaciones discriminatorias que producen cambios en la afinidad de la transcriptasa inversa (*Reverse Transcriptase*, RT) por los ITIANs. La escisión fosforilítica es el principal mecanismo de acción de resistencia a los ITIANs. Se basa en la hidrólisis dependiente de ATP del ITIAN unido a la enzima que está bloqueando el crecimiento de la cadena viral (**Figura 1.11**). Este mecanismo es propio de las mutaciones de desbloqueo de cebadores o TAMs (Mutaciones Análogos de Timidina)(Clutter et al., 2016).

Las TAM incluyen M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y y K219Q/E (Miller et al., 2004). Por último, algunas cepas desarrollan la inserción 69 (T69S_SS) que se asocia con la acumulación de TAMs causando resistencia a todos los ITIAN (Masquelier et al., 2001).

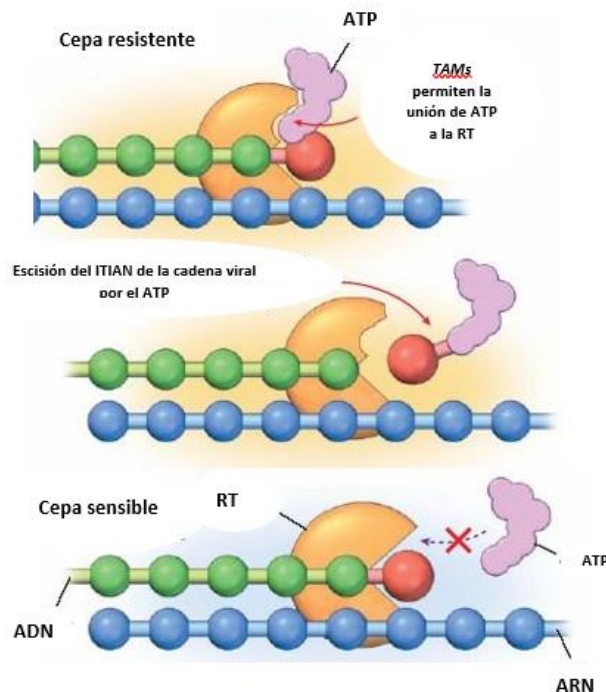


Figura 1.11 Mecanismo de resistencia de RT a ITIANs mediante escisión fosforilítica. Adaptado de (Clavel & Hance, 2004)

Las mutaciones discriminatorias permiten que la RT pueda discernir selectivamente incorporar entre el ITIAN y el dNTP natural. De esta manera favorece la afinidad por el sustrato natural, dNTPs, y permite continuar con la síntesis de la cadena viral y consecuentemente con la replicación viral (**Figura 1.12**) (Miller et al., 2004).

Las mutaciones discriminatorias más comunes incluyen M184V/I, K65R, K70E/G, L74V, Y115F y el complejo de mutaciones Q151M.

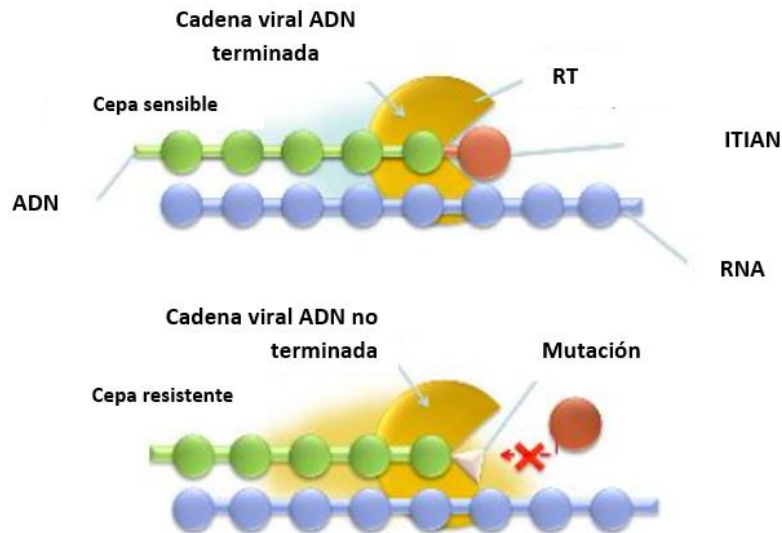


Figura 1.12 Mecanismo de Resistencia a ITIANs mediante la disminución de afinidad Adaptado de (Clavel & Hance, 2004)

1.6.5.2 Resistencia a inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

El mecanismo de resistencia a este grupo de fármacos se debe en muchos casos a la pérdida de interacciones hidrofóbicas que estabilizan la unión entre el no análogo y la enzima (**Figura 1.13**). Muchas de las mutaciones desarrolladas producen resistencia frente a dos o más ITINANs, NVP y EFV tienen una baja barrera genética, pero ETR y RPV tienen una barrera genética superior (Melikian et al., 2014). Las mutaciones de ITINANs más comunes son A98G, L100I, K101E/P, K103N/S, V106A/M, V108I, V179D, Y181C/I/V, Y188C/H/L, G190A/S, P225H y F227L. Otras menos comunes son G190E/Q, M230L y K238.

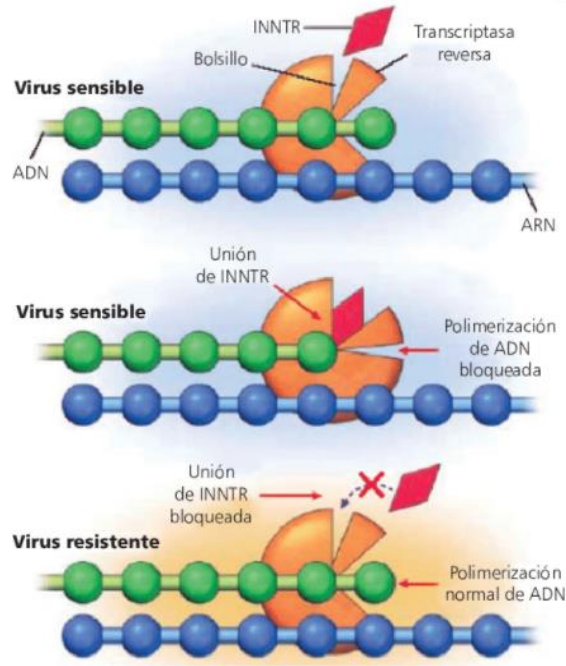


Figura 1.13 Mecanismo de resistencia a ITINAs mediante inhibición alostérica. Adaptado de (Clavel & Hance, 2004).

1.6.5.3 Resistencia a los inhibidores de proteasa.

Las resistencias a los IP son consecuencia de las mutaciones producidas en el sitio de unión entre el sustrato y la enzima o en sitios distantes (Kaplan et al., 1994). La geometría del sitio catalítico de la enzima se ve alterada y ampliada por estas mutaciones (**Figura 1.14**).

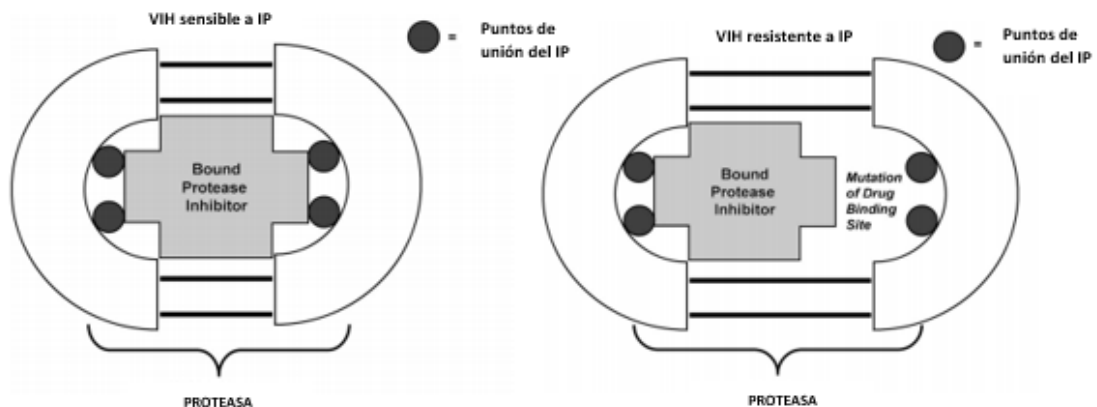


Figura 1.14 Proteasa del VIH-1. Proteasa *wild type* (izquierda) y Proteasa con mutaciones de resistencia (derecha) que producen baja afinidad a los IPs (Zdanowicz, 2006).

Una característica importante de los IPs y en concreto de los IPs potenciados, es su elevada barrera genética frente al desarrollo de resistencias que favorece que el virus no seleccione ninguna mutación en pacientes naïve o con fallo virológico tratados con IPs sin mutaciones basales; la existencia previa de mutaciones de resistencia en la proteasa provoca una reducción de la barrera genética y los fallos virológicos son más frecuentes, así como la posibilidad de desarrollar nuevas mutaciones. En esta situación se ha observado que los IPs de última generación, especialmente el darunavir, ofrecen una barrera genética más elevada que los otros IPs (Ribera et al., 2011).

Las principales mutaciones de resistencia de la proteasa reducen la susceptibilidad a uno o varios IPs, aparecen en la **Tabla 1.5**.

Tabla 1.5 Mutaciones principales de resistencia a inhibidores de proteasa (Adaptado de *Stanford HIV DATABASE*)

	CODONES												
ARV	30D	32V	33L	46M	47I	48G	50I	54I	76L	82V	84I	88N	90L
ATV/r		I	F	IL	V	VM	L	VTALM		ATFS	V	S	M
DRV/r		I	F		VA		V	LM	V	F	V		
FPV/r		I	F	IL	VA		V	VTALM	V	ATSF	V		M
IDV/r		I		IL	V			VTALM	V	AFTS	V	S	M
LPV/r		I	F	IL	VA	VM	V	VTALM	V	AFTS	V		M
NFV	N		F	IL	V	VM		VTALM		AFTS	V	DS	M
SQV/r						VM		VTALM		AT	V	S	M
TPV/r		I	F	IL	VA			VAM		TL	V		

1.6.5.4 Resistencias a los inhibidores de integrasa.

Los inhibidores de integrasa son los más novedosos, se dividen en 2 grupos según la barrera genética frente a las resistencias. Los INIs de primera generación (Raltegravir, Elvitegravir) y de segunda generación (Dolutegravir, Bictegravir), con baja y alta barrera genética, respectivamente (Thierry et al., 2017). Las mutaciones que pueden afectar a los distintos INIs se pueden ver en la **Tabla 1.6**.

Tabla 1.6 Mutaciones principales de la resistencia a los inhibidores de integrasa (Adaptado de *Stanford HIV DATABASE*)

	CODONES									
ARV	30D	92E	118G	138E	140G	143Y	147S	148Q	155N	263R
Bictegravir (BIC)	K	Q	R	KAT	SAC			HRK	H	K
Dolutegravir (DTG)	K	Q	R	KAT	SAC			HRK	H	K
Elvitegravir (EVG)	AIK	Q	R	KAT	SAC		G	HRK	H	K
Raltegravir (RAL)	AIK	Q	R	KAT	SAC	RCH		HRK	H	K

1.6.6 Técnicas de detección de resistencias

Las técnicas de detección de resistencias facilitan el perfil de susceptibilidad de los fármacos en cada paciente para establecer un TAR correcto desde el principio, seleccionando los antirretrovirales más efectivos frente a las cepas que hayan infectado al paciente y pudiendo evitar el fracaso terapéutico por fallo virológico.

1.6.6.1 Técnicas fenotípicas

Proporcionan información cuantitativa de la susceptibilidad del virus a los antirretrovirales. Por ese motivo, es la técnica de referencia, porque valoran con mayor fidelidad la sensibilidad del virus frente a cada fármaco, y según este grado de sensibilidad se podría valorar en un futuro la posibilidad de sobrepasar la resistencia aumentando los niveles plasmáticos del fármaco (Zdanowicz, 2006).

La resistencia fenotípica se expresa en términos de concentración, es decir, la concentración de fármaco necesaria para reducir replicación viral o componente biológico en un 50%, conocido como **CI50**. Los valores obtenidos de la muestra del paciente se comparan con los de una cepa salvaje de referencia de laboratorio o cepas infectantes del propio paciente previamente al TAR. La diferencia entre el valor CI50 entre ambas cepas nos proporciona el grado de resistencia de la cepa de VIH-1 resistente. El número de veces que aumenta el CI50 respecto a la cepa de referencia, indica que es necesaria una mayor cantidad de fármaco para inhibir el crecimiento del virus del paciente *in vitro* (García et al., 2011). Sin embargo, los estudios fenotípicos son poco viables, principalmente por su dificultad, laboriosidad de la técnica y el tiempo.

Las técnicas más empleadas para el estudio de resistencias fenotípico son el uso de virus recombinantes y el fenotipo virtual. Los tres **ensayos de virus recombinantes** que se comercializan son: *Antivirogram (Tibotec-Virco)*, *PhenosenseTM (Virologic)* y *PhenoscriptTM (Viralliance-SAS)*. Los virus recombinantes se utilizan en casi todos los ensayos de susceptibilidad. Estos virus recombinantes son creados mediante la inserción de segmentos de genes del virus del paciente amplificados por PCR (proteasa, RT, integrasa, o gen *env*) en un clon de laboratorio *wild type* (Petropoulos et al., 2000).

Por otro lado, el **fenotipo virtual** se basa en interpretar los resultados de un análisis genotípico. Predice de forma cuantitativa la sensibilidad viral comparando las secuencias de la proteasa, RT e integrasa que queremos evaluar con bases de datos que albergan información de miles de genotipos y fenotipos. El fenotipo virtual nos muestra el cambio de CI50 esperado para cada fármaco basándose en los miles de

fenotipos con el mismo patrón de mutaciones. Estas bases de datos se actualizan constantemente para poder asegurar la máxima fiabilidad en las predicciones.

Las herramientas más conocidas para obtener el fenotipo virtual están diseñadas por *Virco*, conocida como *vircoType HIV-1* y *geno2pheno*.

1.6.6.2 Técnicas genotípicas

Los ensayos genotípicos analizan el genoma del VIH para detectar mutaciones específicas que pueden conferir resistencia a los medicamentos. Esta determinación de resistencias ayuda a comprender el riesgo o motivo del fracaso terapéutico. Hay diversas técnicas, pero la técnica de referencia es la **secuenciación de ADN**. Se analizan las secuencias de la retrotranscriptasa (RT), proteasa e integrasa, en busca de mutaciones que confieran resistencia al tratamiento antirretroviral. Aunque también se analizan otras regiones como es el gen *env*, para detectar mutaciones de resistencias a los inhibidores de entrada y de fusión.

Es complicado tener un profundo conocimiento del significado clínico de todas las mutaciones, por eso las pruebas genotípicas se suelen acompañar de una interpretación de las mutaciones encontradas. Se debe interpretar el resultado de las pruebas de resistencia teniendo en cuenta la historia previa del TAR y, en su caso, estudios previos de resistencias que se hayan realizado al mismo paciente, intentando disponer del genotipo previo que se haya obtenido.

Los ensayos genotípicos son relativamente baratos y ahora se pueden realizar rápidamente con kits comerciales. Los ensayos de secuenciación comerciales más frecuentes son *TRUGENETM HIV-1 Genotyping Test (Siemens NAD)* y *ViroSeqTM HIV genotyping system (Abbott Diagnostics)*. También pueden realizarse mediante secuenciación masiva (NGS) o mediante técnicas de detección de mutaciones puntuales (Clutter et al., 2016).

Ambas técnicas presentan dificultad para detectar variantes resistentes con frecuencias menores del 15-20% en la población viral o con viremia menor de 1.000 cp/ml (García et al., 2011). Se recomienda realizar un estudio genotípico de resistencias a todos los pacientes previamente al comienzo del TAR, una vez diagnosticada la infección y en el momento de realizar un cambio en el TAR en caso de fracaso virológico.

1.6.6.3 Resistencias en la RDC

En los últimos años se han alcanzado prevalencias del 10% de resistencias frente a los antirretrovirales en varios países (Günthard et al., 2019; Stadel & Richman, 2013). África Sub-Sahariana tiene la mayor prevalencia del VIH-1 en todo el mundo y el acceso a tratamientos antirretrovirales se ha expandido en los últimos años para llegar a millones de personas infectadas, aunque el acceso no es universal. Hay pocos datos sobre la epidemiología de la farmacoresistencia primaria del VIH-1 después del comienzo del tratamiento antirretroviral en África Sub-Sahariana, y en menor medida, en la República Democrática del Congo (Sigaloff et al., 2012).

En concreto, en la capital de la RDC, Kinshasa, pocos estudios han evaluado la prevalencia de resistencia a antirretrovirales. Un estudio que utilizó muestras recogidas en 2007 en un grupo de 94 militares VIH+, para investigar las variantes genéticas del VIH y la presencia de mutaciones de resistencia a ARVs. No se encontró ninguna mutación de resistencia a ITIANs o ITINANs y sólo en un caso, una mutación de resistencia a un IP (Djoko et al., 2011). En otro estudio realizado en 2008 por *Muwonga* y colaboradores, encontraron en muestras de 289 personas VIH+ atendidas en 3 centros médicos de Kinshasa, que el 9% (26 pacientes) presentaban mutaciones de resistencia a al menos a un fármaco del TAR prescrito. La proporción de pacientes con resistencia a sus tratamientos fue del 4% en pacientes en tratamiento antirretroviral durante 12-23 meses, 14% tras 24-35 meses y 9% para personas en tratamiento durante más de 35 meses (Muwonga et al., 2011).

Por otro lado, otro estudio realizado en la región de Nord Kivu, al noreste de la RDC, notificó una prevalencia de mutaciones de resistencia del 47% (Boillot et al., 2016). En Lubumbashi, en la zona Meridional, otro estudio recopiló datos de resistencia en un ensayo clínico con diferentes regímenes de tratamiento y no se encontraron mutaciones de resistencia a los IPs, pero sí mutaciones de resistencia a los ITIANs en un 86,3% y simultáneamente a ITIAN y ITIANs del 68,2% de los participantes (Clumeck et al., 2014).

La diversidad genética del VIH-1 descrita, así como las resistencias a los fármacos antirretrovirales pueden comprometer la efectividad del tratamiento especialmente en ausencia de una monitorización virológica que permita detectar las posibles resistencias precozmente y no una vez se ha producido el fracaso del tratamiento. En el contexto socio-económico actual de la RDC, es necesario al menos la realización de estudios de vigilancia de resistencias para poder informar a las autoridades sanitarias y poder adaptar así las recomendaciones locales de tratamiento antirretroviral. De esta manera se puede evitar el incremento de dichas mutaciones de

resistencia a los antirretrovirales. Esto proporcionará datos acerca del VIH-1 en Kinshasa, RDC, y situar la investigación de esta zona en el marco científico de manera urgente para mejorar la situación sanitaria frente al VIH-1 tanto individualmente a nivel de un país como a nivel mundial.

1.7 Muestras en gota de sangre seca (*Dried Blood Spots*)

Las gotas de sangre seca o *dried blood spots* (DBS) son muestras que se recogen en papeles de filtro en modo de tarjeta. Son muestras recogidas de manera menos invasiva en comparación con el procedimiento habitual para tomar sangre; facilitan la toma, almacenaje y envío de muestras a laboratorios de referencia (Ostler et al., 2014). La recogida de muestras en papeles de filtro está considerada una alternativa barata y práctica al plasma para la monitorización del TAR, principalmente en laboratorios con equipamientos limitados y sin acceso a cadenas de frío y/o refrigeración como ocurre en los países en vías de desarrollo (Lofgren et al., 2009). Dichas muestras pueden emplearse para el diagnóstico serológico o carga viral (Andreotti et al., 2010; Leelawiwat et al., 2009), monitorización de mutaciones de resistencias a los antirretrovirales (Lira et al., 2010; Steegen et al., 2007) diagnóstico perinatal y detección del antígeno p24 viral, así como la identificación de variantes del VIH-1 (de Mulder & Holguín, 2013; Johannessen et al., 2011). La experiencia de cribado en neonatos empleando DBS ha mostrado ser eficaz y sencilla, además los DBS también han sido empleados para el diagnóstico de diversas enfermedades genéticas, metabólicas e infecciosas. Actualmente no está aprobado el uso de los DBS para cuantificar linfocitos CD4+ por inmunoensayo, por la poca correlación con los valores obtenidos mediante citometría de flujo. Sin embargo, se han obtenido buenos resultados en diferentes estudios sobre el uso del DBS para el diagnóstico de otras infecciones como sarampión, VIH, Hepatitis C, Hepatitis E o poliomielitis (Singh et al., 2014; Soulier et al., 2016; Su et al., 2018; Weldon et al., 2016).

La técnica del DBS consiste en realizar un pinchazo en el dedo o el talón y depositar la sangre directamente sobre un papel de filtro que se deja secar a temperatura ambiente. Una vez seco, se almacena si es posible, en nevera o preferentemente en congelador en el punto de recogida de muestras, almacenados en bolsas de plástico cerradas e individuales, y en el caso de ser posible deberían contener material desecante para reducir la humedad hasta su futuro uso para realizar la cuantificación o caracterización del VIH. El ARN viral permanece estable a temperatura ambiente durante un largo período de tiempo por lo que supone una metodología muy fácil y económica, además facilita el transporte ya que no requiere medidas excepcionales

(Centers for Disease Control and Prevention, 2017) reduciendo el riesgo biológico al perder infectividad en la matriz del papel de filtro durante el secado de la muestra (Johannessen et al., 2011).

A la hora de realizar el diagnóstico de la infección hay que tener en cuenta diferentes variables que afectan a la integridad del material genético extraído del fluido seco en el DBS y por tanto a los resultados obtenidos en las determinaciones hechas con DBS. Entre ellas se incluyen la forma de realizar la toma, manipulación y secado correcto de los DBS. La temperatura, humedad y tiempo de almacenamiento hasta su uso influyen ya que la estabilidad del ARN viral variará según dichas condiciones, manteniéndose más estable si se encuentra a temperaturas bajas. Numerosos estudios han comparado la integridad del material genético extraído de los DBS considerando distintas temperaturas y grados de humedad durante la toma de la muestra, el transporte y el almacenamiento de los DBS. Para una mejor recuperación del ARN viral para la detección de resistencias o de CV se ha visto que los DBS deben ser almacenados lo antes posible en un congelador a -20°C , y preferiblemente a temperaturas muy bajas (-80°C). Ello contribuirá a mantener la integridad del ARN de la muestra hasta su procesamiento. Sin embargo, cuando la criopreservación no es posible, los DBS pueden ser almacenados o transportados a temperatura ambiente hasta 14 días después de su toma. Después de ese tiempo deben ser procesados o almacenados en frío. El ADN es más estable que el ARN, y en los DBS ocurre de manera similar. (Leelawiwat et al., 2009). El ARN en los DBS y DPS (plasma en DBS) puede ser estable al menos durante un año a -70°C (Brambilla et al., 2003; Lira et al., 2010) o incluso más. En la siguiente tabla podemos observar varios ejemplos de tarjetas (**Tabla 1.7**).

Tabla 1.7 Tipos de tarjetas para muestras biológica. Adaptado de (de Mulder & Holguín, 2013).

TARJETAS	FABRICANTE	INDICACIONES	MUESTRAS EMPLEADAS
WHATMAN 903	<i>Whatman (GE Healthcare)</i>	ARN ADN Anticuerpos Proteínas Otros	Sangre, Otros fluidos corporales
FTA	<i>Whatman (GE Healthcare)</i>	Solo ADN	Sangre Células Tejido animales Tejidos vegetales Cultivos celulares Microorganismos
ISOCODE STIX	Schleicher & Schull Bioscience	Solo ADN	Sangre, Otros fluidos corporales

El **número de círculos de sangre seca** usados en la extracción, así como el **volumen de sangre en cada círculo** también afecta las determinaciones serológicas y moleculares. Se ha evaluado la eficacia de las distintas técnicas analíticas en DBS almacenados durante distintos tiempos hasta su uso, comparando las metodologías en DBS, DPS y plasma y empleando distinto número de círculos en la extracción. Se debe tener en cuenta que los diferentes **métodos para la extracción** del material genético (ARN y/o ADN) del DBS también pueden afectar a la muestra, así como las técnicas usadas para la cuantificación viral y de determinación de resistencias ligados al tamaño del fragmento viral amplificado del DBS, la variabilidad genética del VIH y la interferencia del ADN proviral en las determinaciones. La estabilidad del ARN viral recuperado y el rendimiento de la cuantificación de CV y monitorización de resistencias a partir del DBS será mayor cuanto menor sea la temperatura, la humedad y el tiempo de almacenamiento del DBS hasta su procesado (de Mulder & Holguín, 2013).

1.7.1 Carga viral en DBS

La carga viral realizada sobre DBS es una opción válida para la monitorización del TAR (Boillot et al., 2016), sin embargo, en la región de Kinshasa no se han realizado muchos estudios. Otros estudios publicados también han comunicado la utilidad del DBS en entornos variados con diferentes condiciones climáticas y de almacenamiento, utilizando una serie de diferentes ensayos comerciales en entornos con recursos limitados en África Sub-Sahariana y Asia (Rutstein et al., 2015; Tola et al., 2021). Esto se debe a que la detección del fracaso virológico es difícil debido al coste del

equipamiento necesario, la falta de personal cualificado o transporte y almacenamiento adecuado de muestras desde zonas poco pobladas y remotas hasta los laboratorios y hospitales. Puede también generar falsos positivos debido a la detección de ADN proviral, cuando el volumen de la carga viral es bajo en las muestras (Alvarez-Muñoz et al., 2005; de Mulder & Holguín, 2013). También el método de extracción del DBS afecta a la cuantificación, a su rango de sensibilidad y valores por lo que es mejor utilizar el mismo método de cuantificación durante la monitorización de un paciente.

En los últimos años han disminuido los costes de las pruebas de carga viral: muchos países en vías de desarrollo ahora pueden comprar reactivos para poder realizar ensayos de carga viral. Sin embargo, los requisitos de infraestructura para la expansión de la monitorización siguen siendo uno de los principales problemas. Esto ha llevado a emplear en mayor medida el uso de gotas de sangre seca (DBS) para las pruebas de carga viral (Schmitz et al., 2016). Hay que tener en cuenta que el DBS no debe reemplazar el plasma, pero sí que debe utilizarse para ampliar el acceso al diagnóstico en aquellos lugares donde sea difícil llegar y puedan realizarse cuando se necesite y de forma rutinaria. Según el estudio realizado por *E Schmitz* y colaboradores, las pruebas de DBS para carga viral, ya sea mediante sangre venosa, microcapilar o gotas de sangre directas, utilizando dos puntos de 50 µL en la plataforma Abbott es una alternativa comparable y práctica al plasma para la cuantificación de la carga viral entre adultos y niños con experiencia en TAR en los países en vías de desarrollo. Esto da cierto apoyo a los países a construir sistemas de monitorización que sean sostenibles para lograr el tercer objetivo del 90-90-90 (Schmitz et al., 2016).

1.7.2 Detección de resistencias a los antirretrovirales en DBS

El uso de los DBS para el estudio de mutaciones de resistencia está aumentando en los países en vías de desarrollo. Se ha visto que las muestras DBS pueden aguantar desde 3 a 6 meses con el material genético estable desde temperaturas de -70°C a 37°C para realizar técnicas de genotipado, aunque la degradación del ARN siga produciéndose (McNulty et al., 2007). Además, la tasa de éxito de amplificación del material genético del VIH-1 empleando DBS difiere según la carga viral de las muestras y de las condiciones de almacenamiento de los DBS antes de su procesamiento, del método de extracción de ARN empleado y de la longitud de la región del VIH que queramos amplificar. La amplificación y detección de las resistencias será más eficaz a partir de los 3 logaritmos de copias ARN-VIH/ml reduciéndose drásticamente en muestras con CV indetectables (<20-100 cp/ml, según la técnica) (Bertagnolio et al., 2010). La OMS recomienda su uso en los países menos favorecidos, donde los recursos

son limitados, para la vigilancia de resistencias a fármacos del VIH-1 en los pacientes naïve y para monitorizar a aquellos pacientes con resistencias (World Health Organization, 2015)

Muchos ensayos genotípicos de resistencia se han realizado con kits comerciales, pero la mayoría de los estudios genotípicos que detectan resistencias utilizando un protocolo casero de amplificación basados en *nested* RT-PCR. Tienen un menor coste, son más numerosos y parecen ser tanto o más eficientes que algunos de los kits comerciales. Ello se debe a que en muchas ocasiones las PCR caseras amplifican la proteasa y transcriptasa inversa por separado, y la amplificación de regiones más cortas es más eficaz que las largas empleando DBS, aumentando así la eficacia. En cualquier caso, cualquier técnica de detección de resistencias, tanto casera como comercial, requiere una buena integridad del ARN y, por tanto, las mismas condiciones favorables de conservación de los DBS (de Mulder & Holguín, 2013).

Los resultados de las pruebas de genotipo a partir de muestras de DBS también deben tener en cuenta la **interferencia del ADN proviral**. Como el ADN es más estable que el ARN, el ARN viral en el componente plasmático puede degradarse más rápido que el ADN proviral si el almacenamiento del DBS no es el correcto. En consecuencia, los resultados de genotipado del VIH-1 basados en DBS podrían reflejar contribuciones desproporcionadas de ADN proviral a la determinación general de las resistencias del VIH-1 a los antirretrovirales. Varios autores han descrito interferencias del ADN proviral en la cuantificación basada en amplificación por PCR a tiempo real y en los resultados genotípicos de resistencia, que puede llevar a problemas a la hora de interpretar un resultado positivo, principalmente cuando en las extracciones de ácidos nucleicos que recuperan tanto ADN como ARN al no incluir tratamiento con DNasas (de Mulder & Holguín, 2013; Waters et al., 2007). Esto se puede minimizar tratando los DBS previamente con DNasas para asegurar que solo se amplifica y cuantifica ARN viral (Monleau et al., 2010). El efecto provocado por el ADN proviral extraído de la sangre seca contribuye al producto de la amplificación de ácidos nucleicos en ausencia de transcriptasa inversa (Masciotra et al., 2007) obteniendo un resultado sobreestimado del ARN presente en las muestras de DBS. A mayor carga viral de la muestra y a mayor tiempo de almacenamiento de los DBS hasta su uso para la detección de resistencias, aumenta la degradación del ARN respecto del ADN en los DBS interfiriendo en los resultados finales. Además, el efecto del ADN proviral en la carga viral está influido por la eficacia del tratamiento antirretroviral en el paciente. De esta manera, los pacientes con fallo virológico tienden a tener más mutaciones de resistencia a fármacos en plasma que en células infectadas, cuando la carga viral es baja. Por el contrario, en aquellos

pacientes que han interrumpido el tratamiento, el ADN proviral obtenido a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) puede actuar como un archivo de mutaciones de resistencia de tratamientos pasados, y los DBS darían más información en lugar del plasma en este tipo de pacientes (de Mulder & Holguín, 2013).

1.7.3 Genotipado en DBS

Las variantes no-B, tanto subtipos no-B como recombinantes del VIH-1 causan el 90% de las infecciones por VIH-1 y son prevalentes en la mayoría de los países en vías de desarrollo. Dichos países tienen poca capacidad sanitaria por lo que implantar el uso de los DBS ofrece ventajas frente a la metodología convencional en estas áreas. Esta variabilidad genética puede afectar a la eficacia de técnicas de amplificación del material genético viral extraído del DBS para carga viral como para detectar resistencias a los antirretrovirales (Buckton, 2008). Pueden dar lugar a falsos negativos o fallos de sensibilidad en las técnicas de diagnóstico al estar principalmente diseñadas y validadas para detectar el subtipo B, el subtipo más prevalente en los países económicamente desarrollados (Alvarez et al., 2015; Holguín et al., 2008; Maritz et al., 2014). Para grandes estudios epidemiológicos las muestras de DBS constituyen una vía económica y práctica de tomar muestras abarcando grandes áreas, facilitando aquellas donde no se puede llegar con material convencional. De esta manera, estos estudios pueden llevar a cabo análisis de la distribución global del VIH y sus variantes genéticas.

Como se ha explicado previamente, la RDC y especialmente su capital Kinshasa, se caracterizan por ser unas de las zonas con mayor diversidad genética de África Sub-Sahariana. El estudio realizado por Boillot y colaboradores (Boillot et al., 2016) en el que enviaron las muestras de DBS recogidas en la región congoleña de Nord Kivu a laboratorios en Francia y observaron que la combinación entre DBS y técnicas de carga viral eran adecuadas para monitorizar a los pacientes. Son necesarios más estudios e investigación acerca de las variantes circulantes del VIH-1, así como el desarrollo de resistencias a los antirretrovirales ya que la información es limitada en las diferentes zonas del país.

1.8 Objetivo 95-95-95

En el año 2016, mediante la Declaración política de la Asamblea General de las Naciones Unidas para poner fin al SIDA, los países se comprometieron a alcanzar los objetivos 90-90-90 para el año 2020. Su propósito era que, para finales de 2020, el 90% de las personas que viven con VIH supieran su estado serológico, el 90% de esas personas estuviera en tratamiento antirretroviral y finalmente el 90% de las personas en TAR estuviera en supresión viral. Además, se propuso el 95-95-95 para el año 2030, alcanzando un 95% de cobertura antirretrovírica y supresión viral, un límite de 200 000 nuevas infecciones y cero discriminaciones; poniendo como fin a la epidemia del VIH/SIDA como una de las principales amenazas de salud pública mundial (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), 2014).

En todo el mundo, se han alcanzado éxitos destacables, sin embargo, en muchos países no se han alcanzado los objetivos propuestos y no se han alcanzado los objetivos 90-90-90 a nivel global. A finales del 2020, había un 84% de personas en todo el mundo que viven con VIH sabía su estado serológico, y un 73% estaba en tratamiento antirretroviral, es decir 27.5 millones de personas tenían acceso al TAR (**Figura 1.15**). Los datos reflejan cómo las políticas adoptadas por ONUSIDA y los diferentes países de todo el mundo han hecho posible el incremento en los objetivos propuestos en 2016.

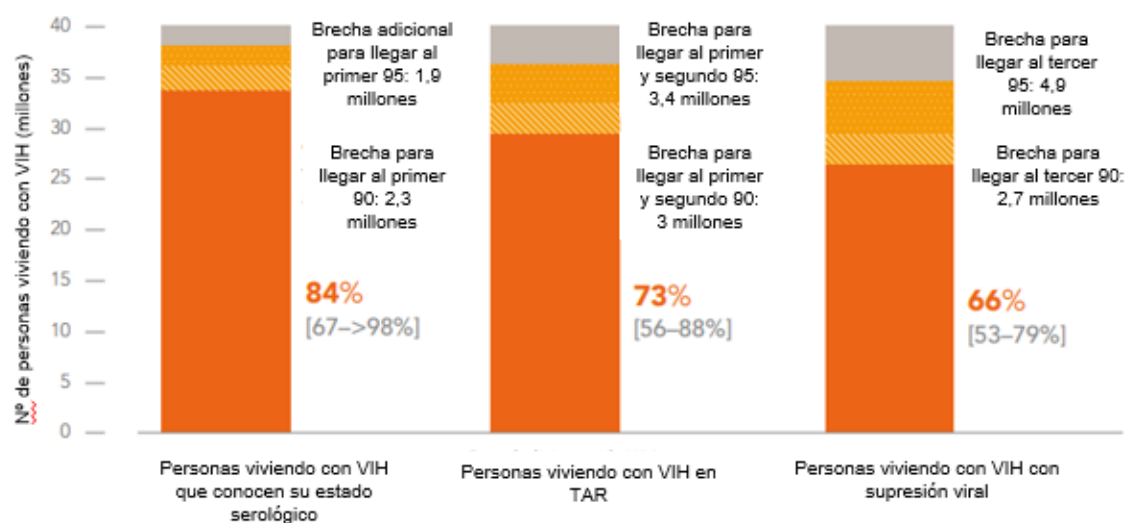


Figura 1.15 Datos globales VIH 2020. Cascada de pruebas y tratamiento. (Adaptado de (UNAIDS, 2021)

Un estudio llevado a cabo por ONUSIDA y la OMS muestra que una interrupción considerable en los tratamientos para el VIH llevaría a más muertes relacionadas con el SIDA en ASS, 500.000 muertes adicionales para finales de 2021. Varios países han

declarado reducciones de hasta un 20% en el suministro de medicamentos en varias zonas geográficas, y un gran número de denuncias por parte de personas que viven con el VIH por no disponer de antirretrovirales para un confinamiento de más de 60 días (UNAIDS, 2020). Gracias a los esfuerzos realizados por ONUSIDA, OMS y los distintos países que han acogido los programas de prevención de VIH propuestos, y mediante la comunicación y recopilación de datos acerca de los diagnósticos, tratamientos y personas en supresión viral se ha conseguido cada año informes del estado en que se encuentran muchos países en relación a los objetivos 90-90-90 y ahora continúan para llegar a los objetivos del 95-95-95.

La epidemia en el centro y oeste de África no ha recibido la misma atención internacional que el este y sur de África por tanto el progreso ha sido menor. A pesar de la presencia de los programas de prevención, aún queda un largo camino para que esta región africana pueda llegar a los objetivos 95-95-95 ya que, a finales de 2020, solamente un 77% conoce su estado serológico, un 73% de las personas de la región está en tratamiento antirretroviral y un 59% está en supresión viral. Una mejora significativa respecto al año 2019 donde solo el 45% de las personas estaban bajo supresión viral (**Figura 1.16**).

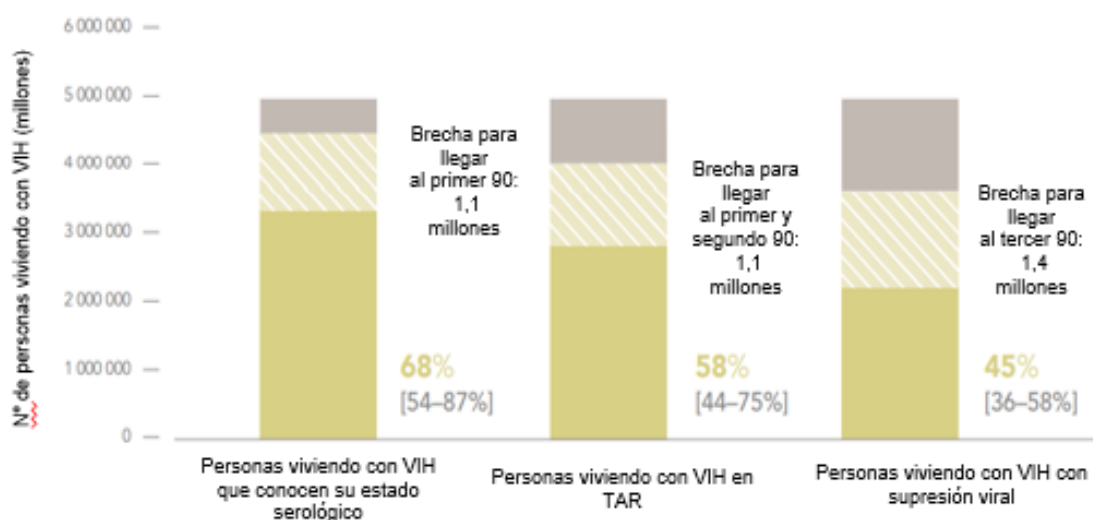


Figura 1.16 Objetivos 90-90-90 en África Central y Occidental en 2019. Adaptado de (UNAIDS, 2020)

De las 510 000 personas que viven con VIH en la RDC, el 75% (64-86%) conoce su estado serológico y el 75% (63-86%) tuvo acceso al tratamiento antirretroviral en 2020, mejorando de manera significativa respecto al 2019 (**Figura 1.17**). Sin embargo, aún no se conocen los datos de la supresión viral de los pacientes en TAR en el país.

A pesar de las medidas aplicadas sigue siendo complicado que las personas que comienzan el tratamiento antirretroviral permanezcan en él; los factores suelen ser muy variados, desde el transporte para poder llegar al lugar de tratamiento, factores religiosos etc. Por otro lado, el TAR se muestra efectivo ya que cada año el número de nuevas infecciones y muertes desciende, ya que desde 2010 se han reducido un 60% las muertes relacionadas con VIH. Sin embargo, a medida que la esperanza de vida aumenta y la enfermedad se cronifica, la necesidad de recursos (ARVs, atención VIH, monitorización de los pacientes, pruebas de resistencias frente a los ARVs) se hace aún mayor.

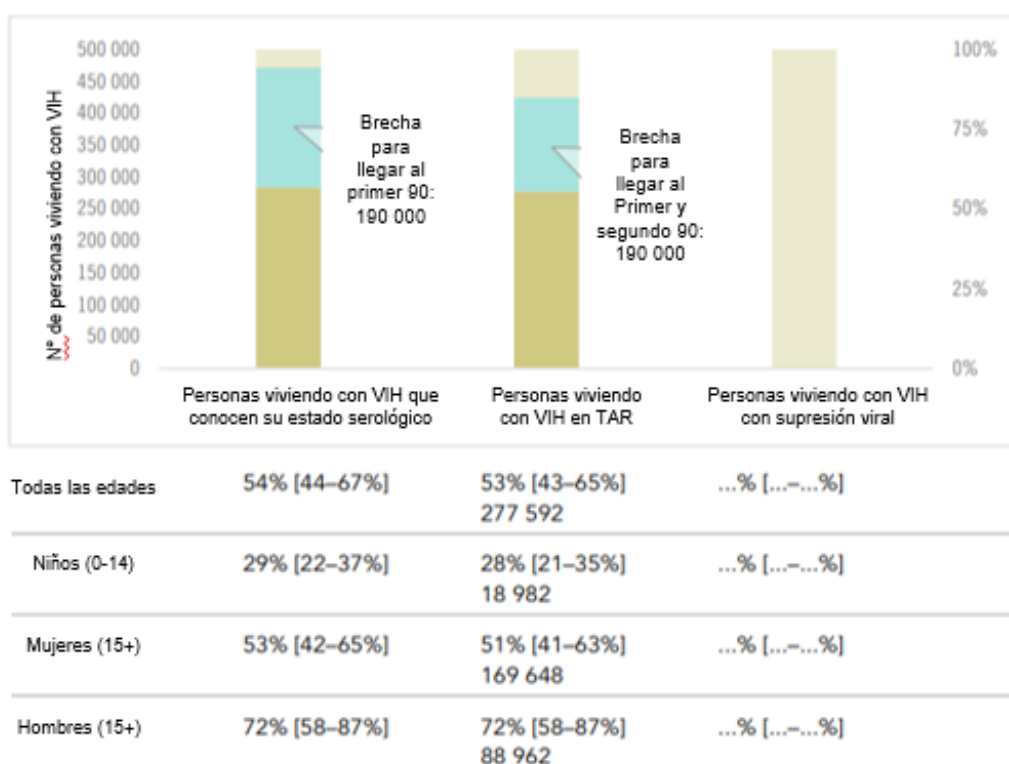


Figura 1.17 Estimaciones epidémicas de la República Democrática del Congo, 90-90-90 en 2019 (Adaptado de (UNAIDS, 2020))

Según ONUSIDA, se están haciendo avances en la epidemia del VIH-1 en este país en términos de diagnóstico y tratamiento. Sin embargo, solo el 75% de las personas que viven con VIH-1 están en tratamiento, por lo que una gran parte de las personas diagnosticadas como VIH-1 positivas todavía no han sido tratadas aumentando así el riesgo de transmisión y favoreciendo la diseminación del virus. A esto hay que sumarle todas aquellas personas que no han sido diagnosticadas o que no quieren realizarse

una prueba de diagnóstico (UNAIDS, 2021). Además, los factores culturales, pero también la situación política del país y los conflictos armados, son factores que juegan un papel en la epidemia del VIH-1. Otro factor importante es el sector sanitario, ya que no tiene la capacidad necesaria para atender a toda la población, las personas tienen un acceso limitado o no tienen a cuidados médicos (UNAIDS, 2021).

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Se plantean las siguientes hipótesis:

1. Las muestras de sangre seca (DBS) son una muestra válida para el diagnóstico serológico del VIH y otros agentes infecciosos de transmisión sexual en Kinshasa.
2. Las muestras de sangre seca (DBS) son una muestra válida para la determinación de la carga viral y secuenciación del VIH de pacientes naïve o en tratamiento antirretroviral en Kinshasa.
3. Las técnicas serológicas y moleculares para detección de VIH pueden presentar distinta sensibilidad para detectar diferentes variantes del VIH.
4. Los diferentes subtipos de VIH-1 que circulan actualmente en Kinshasa pueden tener diferentes patrones de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales.
5. La adherencia inadecuada al tratamiento antirretroviral en pacientes VIH positivos en Kinshasa puede estar asociada con una mayor frecuencia de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales.

OBJETIVOS

La realización de este trabajo pretende contribuir a mejorar la estrategia diagnóstica y de seguimiento de los pacientes infectados por VIH, así como al conocimiento de la epidemiología molecular de la infección en Kinshasa (República Democrática del Congo).

En el marco de los antecedentes expuestos en el capítulo de Introducción, se ha planteado el trabajo experimental de la presente tesis, proponiendo los siguientes objetivos.

Objetivo general

Estudiar la utilidad de las muestras de sangre seca (DBS) para realizar el diagnóstico serológico de VIH y otros agentes de transmisión sexual. Analizar la epidemiología molecular y la presencia de mutaciones de resistencia mediante secuenciación de VIH-1 detectado en muestras de Kinshasa.

Objetivos específicos

1. Analizar la utilidad de las muestras de sangre seca (DBS) de pacientes de nuevo diagnóstico VIH y en fallo virológico, para la realización del diagnóstico serológico y molecular de la infección por VIH en población adulta en Kinshasa, RDC.
2. Analizar la utilidad de las muestras de sangre seca (DBS) para la realización del diagnóstico serológico de otros agentes infecciosos de transmisión sexual diferentes de VIH en población adulta en Kinshasa, RDC.
3. Evaluar la sensibilidad de las técnicas diagnósticas de VIH en muestras de DBS procedentes de Kinshasa, área con alta variabilidad genética del virus.
4. Describir y caracterizar las variantes genéticas de las cepas VIH-1 en población adulta que circulan en pacientes de nuevo diagnóstico y en tratamiento antirretroviral en Kinshasa, RDC y estudiar la evolución de la epidemiología molecular del VIH-1 en esta zona.
5. Analizar las mutaciones de resistencia y la sensibilidad a los ARV en pacientes infectados por VIH con nuevo diagnóstico y en tratamiento antirretroviral en Kinshasa, RDC.
6. Estudiar en pacientes VIH positivos en Kinshasa la asociación entre la adherencia autorreferida al tratamiento antirretroviral, la respuesta al tratamiento y la presencia de mutaciones de resistencia.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño y población de estudio

El presente estudio está enmarcado dentro del proyecto OKAPI (*Observational Kinshasa AIDS Prevention Initiative*). Es un estudio de cohortes prospectivo en el que participan residentes de Kinshasa de 15-59 años que acuden al Centro Hospitalario Monkole a recibir Consejo y Diagnóstico Voluntario de VIH (CDV) entre abril de 2016 y abril de 2019.

El proyecto OKAPI evalúa, por un lado, el impacto del CDV sobre los conocimientos y comportamientos asociados con VIH tras 6 y 12 meses de seguimiento de personas que reciben un test de VIH positivo (nuevos diagnósticos), negativo o indeterminado. Además, se identifican los factores predictores de estos cambios en los conocimientos y comportamientos.

Todas las personas que dan su consentimiento para participar en el estudio contestan a una encuesta basal específica del proyecto de investigación (Q0), a un cuestionario de seguimiento a los 6 (Q6) y 12 meses (Q12) y, en el caso de los participantes VIH positivos, un breve cuestionario específico sobre el tratamiento antirretroviral y la adherencia. El cuestionario basal (Q0) recoge datos sobre conocimientos, actitudes y comportamientos relacionados con la infección por VIH y factores determinantes. Los cuestionarios de seguimiento a los 6 y 12 meses (Q6 y Q12) son cuestionarios más breves para valorar cambios en los conocimientos y/o comportamientos sexuales. El cuestionario de los pacientes positivos recoge la información de la fecha de diagnóstico e inicio del TAR, los ARVs utilizados, los niveles de CD4+ y datos sobre la adherencia del paciente; las variables incluidas fueron: la distancia al centro de distribución de ARVs más cercano, la capacidad de tomar la medicación, el olvido de ARV y la omisión de dosis (**Anexo 1-Figura suplementaria 1.1**).

Además, en el estudio OKAPI, se recogen muestras de sangre seca (*Dried Blood Spots*, DBS) de los participantes que reciben un resultado positivo o indeterminado en el test de diagnóstico de VIH, para realizar el diagnóstico serológico, cuantificación viral, evaluar las variantes circulantes de VIH en Kinshasa, así como la presencia de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales en las cepas que infectan a estos pacientes. El presente estudio está centrado en el diagnóstico de laboratorio.

En el presente trabajo se incluyeron todos los participantes de la cohorte OKAPI que acudieron al Hospital Monkole entre abril de 2016 y abril de 2019 a recibir CDV y obtuvieron un diagnóstico positivo o indeterminado para VIH mediante test de diagnóstico rápido en el origen. Además, se incluyeron pacientes VIH positivos de

Monkole y del Hospital Kalembembe, que se encontraban bajo tratamiento antirretroviral. Por último, se seleccionó un grupo adicional de muestras de población VIH negativa de Monkole como control para los análisis de laboratorio.

3.2 Diagnóstico de infección VIH en la RDC

El diagnóstico serológico del VIH en Kinshasa se realizó en el Centro Hospitalario Monkole utilizando las siguientes pruebas de diagnóstico rápido (PDR) (inmunoensayos): *Alere Determine HIV-1/2 Ag/Ab (Abbott)*, *Double-Check Gold HIV 1&2 (Orgenics)*, y *Uni- Gold HIV (Trinity Biotech)*. El algoritmo utilizado para el diagnóstico de la infección por el VIH en Kinshasa durante 2016-2018 consistía en un resultado positivo con la prueba de Abbott como cribado y luego dos PDRs adicionales realizadas para la confirmación. Si dos resultados de las PDR eran positivos, la muestra se clasificaba como positiva.

En el caso de resultados discordantes, cuando la prueba Abbott de cribado inicial era positiva, pero las dos RDT de confirmación negativas, la muestra se clasificaba como un resultado "indeterminado" y requería pruebas adicionales para el diagnóstico definitivo. En ese caso, al cabo de 2 semanas se programaba una cita con el paciente para una segunda PDR.

3.3 Recogida de muestras de sangre seca (DBS)

A todos los pacientes con un diagnóstico VIH positivo o indeterminado mediante PDR se les recogieron muestras de sangre seca (*Dried Blood Spots, DBS*) mediante un pinchazo, normalmente realizado mediante inoculación tras venopunción. También a un grupo de población adicional VIH negativo.

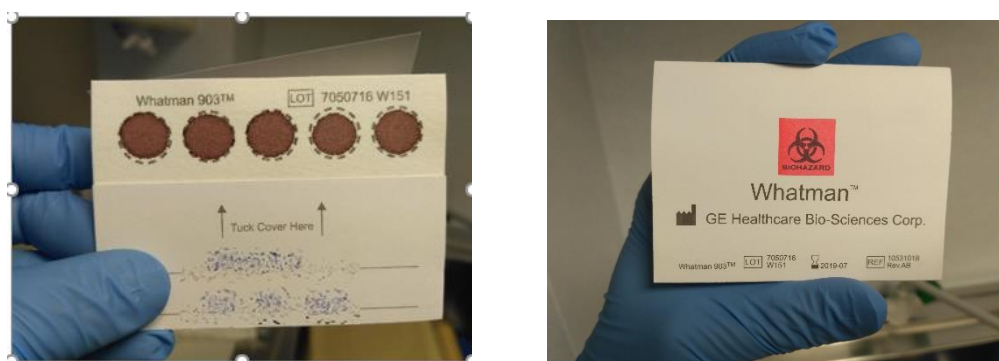


Figura 3.1 Gotas de sangre seca en Tarjetas de transporte biológico *Whatman Paper 903 Protein Saver Card (Schleiche & Schuell, USA)*.

Según el protocolo, se utilizaron tarjetas de transporte biológico *Whatman Paper 903 Protein Saver Card (Schleiche & Schuell, USA)*. Cada tarjeta contiene cinco "dots"

o puntos de sangre. Se recogieron 2 tarjetas por cada paciente y se dispensaron con una pipeta en las zonas destinadas de la tarjeta (**Figura 3.1**). El volumen total de cada gota de sangre, saturado de sangre es de alrededor de 70 μL de sangre, es decir, 350 μL de sangre por tarjeta.

3.3.1 Transporte, almacenamiento y manipulación de los DBS

Tras la recogida, las tarjetas fueron secadas a temperatura ambiente durante mínimo 4 horas. Fueron introducidas y selladas en bolsas de plástico con desecantes y almacenadas a -20°C hasta su transporte en hielo seco al laboratorio de Microbiología en la Clínica Universidad de Navarra (CUN), España. Una vez fueron recibidas en Navarra se identificaron con un número interno para cada tarjeta correspondiente a cada paciente y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

Desde abril de 2016 hasta abril de 2019 se recogieron y enviaron a Pamplona un total de 365 muestras de DBS. A finales de enero del 2018 se unió al envío de muestras de DBS de adultos el Hospital Kalemelembe de Kinshasa (348 muestras DBS de Monkole y 17 DBS de Kalemelembe). El transporte de los DBS se realizó en 3 envíos entre 2016 y 2019, mediante la compañía internacional de mensajería *World Courier*.

Se recortaron cinco gotas de sangre por tarjeta de cada paciente: Un punto de sangre seca para realizar las técnicas serológicas, dos puntos de sangre para llevar a cabo la carga viral y dos puntos de sangre para pruebas moleculares y así establecer los subtipos infectantes y las mutaciones de resistencia a los antirretrovirales (**Figura 3.2**). La segunda tarjeta se almacenó a -80°C para poder realizar análisis en el futuro o repetir pruebas de laboratorio en caso de necesidad.

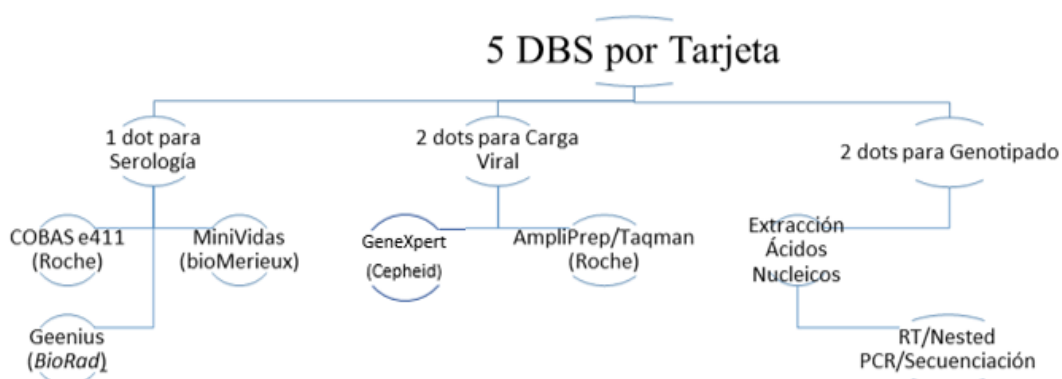


Figura 3.2 Flujo de trabajo a partir de una tarjeta DBS inoculada con sangre.

3.4 Diagnóstico serológico

Posteriormente en el laboratorio de la Clínica Universidad de Navarra, España, la sangre fue extraída de un punto de sangre por elución en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato o PBS (*phosphate buffered saline*), durante 60 minutos a 37°C.

Las muestras fueron analizadas con dos técnicas serológicas *COBAS e411 Elecsys HIV combi PT (Roche)* y *MiniVIDAS HIV Duo Quick (BioMérieux)*, ambas técnicas de cuarta generación (**Figura 3.3**).

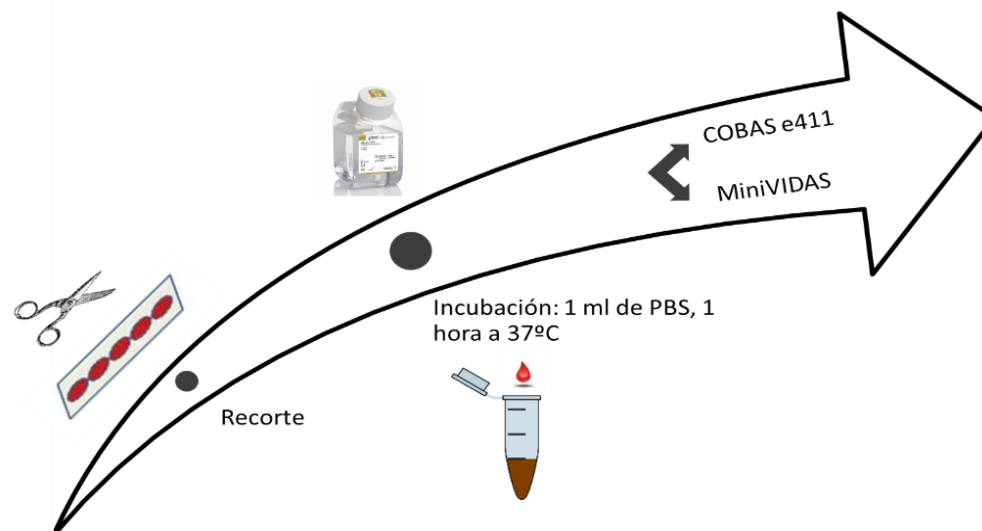


Figura 3.3 Elución del DBS para la realización de las técnicas serológicas.

3.4.1 *Elecsys HIV combi PT (Roche)*

Se trata de un inmunoensayo electroquimioluminiscente de 4ª generación *in vitro* para la detección cualitativa de anticuerpos frente a VIH-1 y simultáneamente, del antígeno p24 de VIH-1, incluyendo el grupo O y el VIH-2 (*ref: 05390095190, Roche*) (**Figura 3.4**). Las reacciones quimioluminiscentes que conducen a la emisión de luz se producen por un proceso eléctrico en vez de químico. Se consiguen aplicando un voltaje a los complejos inmunológicos que están unidos a micropartículas recubiertas de estreptavidina, dando lugar a un control de la reacción de manera más precisa. Los anticuerpos biotinilados y marcados con rutenio se unen al analito/antígeno en una primera incubación; en una segunda incubación los anticuerpos biotinilados se unen a micropartículas magnéticas con estreptavidina formando un complejo inmune. Los complejos inmunes quedan atrapados por magnetismo en la célula de medición; el resto se elimina mediante lavados. Participan dos sustancias electroquímicamente activas: el

complejo de rutenio y la tripropilamina (TPA) que permanecen estables mientras no se aplique un voltaje.

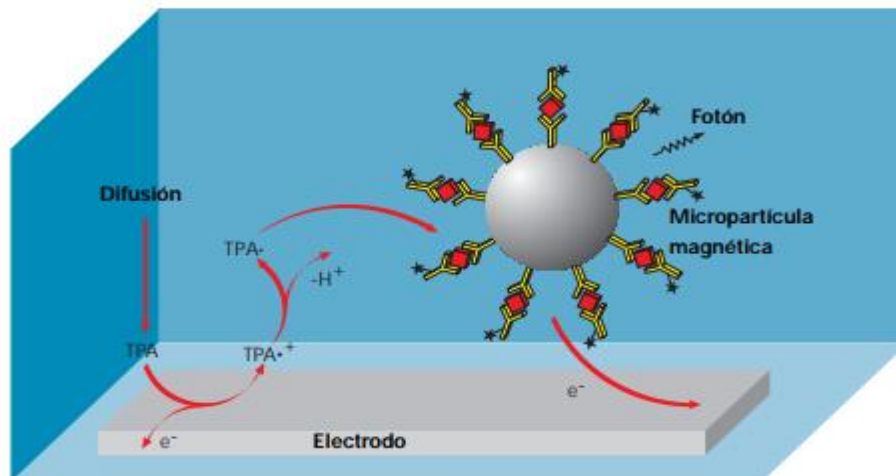


Figura 3.4 Detección de un complejo inmune mediante electroquimioluminiscencia.

Al aplicar un voltaje se produce un campo eléctrico que afecta a todos los componentes dando lugar a reacciones de oxidación-reducción provocando la excitación de cationes que al mismo tiempo liberan fotones, energía (**Figura 3.4**). Dicha energía es la que proporciona un pico de emisión luz que se puede detectar como la señal electroquimioluminiscente resultante y nos proporciona un resultado. La cantidad de luz producida es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra analizada.

Interpretación de resultados

El diagnóstico positivo o negativo está basado en el *cut-off index* (COI): muestras con un índice COI < 1.00 se clasifican como “no reactivas” (negativas); aquellas con un índice COI entre 0.90 y <1.00 se clasifican como “indeterminados” y por último aquellas muestras con un valor COI ≥ 1.00, pertenecen a muestras “reactivas” (positivas). El proceso comenzó con el recorte del punto de sangre y su posterior elución. Se transfirió todo el eluido del DBS a copas específicas del *COBAS e411*. Se usaron 40µL del eluido para llevar a cabo la técnica, por lo que el resto del eluido sobrante se almacenó a -80°C para futuros análisis.



Figura 3.5 Equipo completo *Elecsys COBAS e411 (HIV COMBI PT Roche)*.

Además de las determinaciones para la detección VIH, se realizaron otras determinaciones serológicas a partir del DBS eluido para detectar infección por hepatitis A (*Anti-VHA*), hepatitis B (*AgHBS* y *Elecsys Anti-HBc II*) hepatitis C (*Anti-VHC*), HTLV (*Anti-HTLV-I/II*) y sífilis (*Anti-Treponema pallidum*) (**Tabla 3.1**). En el caso de resultados discordantes con las otras técnicas serológicas, disponíamos de información adicional para la interpretación de los resultados.

Tabla 3.1 Características técnicas de las determinaciones realizadas mediante *Elecsys HIV combi PT (Roche) (COBAS e411)* en función de la diana.

Diana	Volumen (μL)	Duración (minutos)	Criterio Positividad (COI)
Anti-VIH	40	27	$\geq 1,00$
Anti-VHA	50	18	$\geq 1,00$
AgHBS	50	18	$\geq 1,00$
Anti-HBc II	40	27	$\leq 1,0$
Anti-VHC II	50	18	$\geq 1,00$
Anti-HTLV-I/II	30	18	$\geq 1,00$
Anti-T.pallidum	10	18	$\geq 1,00$

3.4.2 Minividas (VIDAS HIV Duo Quick, Biomérieux)

Se trata de un test serológico para detección de patógenos por inmunodetección, basado en la prueba ELISA y técnicas de inmunoconcentración. Es una técnica cualitativa de 4^o generación con una alta sensibilidad y especificidad, con una lectura final de fluorescencia (ELFA) proporcional a la cantidad de anticuerpo/antígeno presente en la muestra de sangre (**Figura 3.6**). Detecta anticuerpo de VIH-1 (Grupos M y O) y VIH-2 y antígeno p24 del VIH-1. Los resultados que se obtienen están relacionados cualitativamente con el valor del test: positivo, negativo o dudoso (en algunos casos) (**Tabla 3.2**). El valor del test se obtiene mediante la diferencia o el ratio entre el valor obtenido mediante fluorescencia de la muestra analizada y el valor estándar. La detección combinada de inmunoglobulinas totales anti-VIH-1 (grupos M y O) y anti-VIH-2 + antígeno VIH-1 p24.

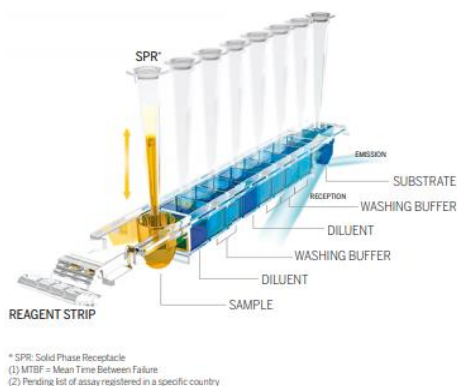


Figura 3.7 SPR (*Solid Phase Receptacle*) o cassette y puntas específicas.



Figura 3.6 Equipo MiniVidas (*VIDAS HIV Duo Quick, Biomérieux*).

A partir del mismo eluido del DBS, se transfirieron 200 μ L a un cassette (SPR) del MiniVidas (*VIDAS HIV Duo Quick ref: 30477; Biomérieux S.A*). La duración de la técnica para el VIH es de 80 minutos. El resto del eluido sobrante de las muestras se almacenó a -80°C para futuras pruebas serológicas.

El criterio utilizado para asignar resultados de falsos positivos se escogió de acuerdo a las discrepancias obtenidas entre ambas técnicas serológicas y considerando los resultados obtenidos de carga viral. Además, se realizaron pruebas serológicas para la detección de anticuerpos frente a la hepatitis B (*VIDAS® HBs Ag Ultra* y *VIDAS® Anti-HBc Total II*) hepatitis C (*VIDAS® Anti-HCV*), virus varicela-zóster (*VIDAS® VARICELLA ZOSTER IGG*) y Rubeóla (*VIDAS® RUB IGG*). Las determinaciones serológicas se llevaron a cabo a partir de la elución del punto de sangre recortado con variación en el volumen de muestra y duración de la prueba según la diana detectada (**Tabla 3.2**).

Tabla 3.2 Características técnicas de las determinaciones realizadas por *Minividas (VIDAS HIV Duo Quick, Biomérieux)* en función de la diana.

Diana	Volumen (µL)	Duración (minutos)	Criterio de positividad (VT)
VIH	200	80	≥ 1,00
ANTI-HBc TOTAL II	150	90	< 1
Anti-VHC	100	40	≥ 1,00
HBs Ag Ultra	150	60 - 90	≥ 0,10

*i = valor de la prueba = RFV paciente / RFV estándar S1; RFV: *Relative Fluorescence Value*; VT: valor del test.

3.4.3 *Geenius (HIV 1/2 Confirmatory Assay, BioRad)*

Se trata de un test de inmunocromatografía para la confirmación y diferenciación de anticuerpos frente al VIH-1 y VIH-2 (**Figura 3.8**). El objetivo de este ensayo consiste en confirmar la presencia de anticuerpos frente a VIH-1 y VIH-2 mediante antígenos inmovilizados, para muestras que resulten ser reactivas cuando se realizan por procedimientos de *screening*. Se pueden emplear muestras de sangre total, suero o plasma.

Cada *cassette* contiene 6 antígenos, uno por banda; 2 para el VIH-2, 4 para el VIH-1 y 1 banda control. Si la muestra contiene anticuerpos frente al VIH, son capturados en el área del test por los antígenos inmovilizados provocando que aparezcan líneas azules/púrpuras en el área de test.

Paso 1.



Paso 2.



Paso 3.



Figura 3.8 Esquema gráfico del proceso para realizar la inmunocromatografía *Geenius*. Inoculación de la sangre total (Paso 1) e inoculación del buffer junto con incubación de 5-7 minutos a temperatura ambiente (Paso 2). Inoculación del buffer e incubación a temperatura ambiente 20-30 minutos y lectura de resultados (Paso 3).

Se analizaron 135 muestras de forma aleatoria de eluido sobrantes de los inmunoensayos *Minividas* y *COBAS e411*. Se inocularon 40µL del eluido en el pocillo específico identificado como *Buffer + Sample* (Fernández McPhee et al., 2015). Inmediatamente después se le añadieron 60µl de Buffer (dos gotas) al mismo pocillo. Se incubó durante 5-7 minutos esperando que desapareciesen las líneas azules/púrpuras que están marcadas desde el principio de la prueba. Sin embargo, si dichas líneas no desaparecen hay que descartar el test de inmediato y repetir con otro cassette.

Una vez terminada la incubación, se inocularon 125µL (5 gotas) del buffer en el pocillo identificado como "*Buffer*" y se incubaron a temperatura ambiente entre 20 y 30 minutos. En ese intervalo de tiempo se leyeron los resultados de la prueba. Finalmente se interpretaron los resultados en función de las bandas obtenidas para la confirmación del diagnóstico y diferenciación de los anticuerpos detectados (**Tabla 3.3**).

Tabla 3.3 Conjunto de bandas que contiene cada cassette de *Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay*.

	Banda	Diana
VIH-1	Banda 3	p31 HIV-1 POL
	Banda 4	gp160 HIV-1 ENV
	Banda 5	p24 HIV-1 GAG
	Banda 6	gp41 (Grupo M y O) HIV-1 ENV
VIH-2	Banda 1	gp36 HIV-2 ENV
	Banda 2	gp140 HIV-2 ENV
	Banda control	Proteína A

Interpretación de resultados

La lectura de los resultados se realizó entre los 20 y 30 minutos de la duración de la prueba según las instrucciones del fabricante. Se recomienda no leer los resultados pasados los 30 minutos de incubación.



Figura 3.9 Cassette Geenius BioRad.

Los criterios de interpretación que se utilizaron para clasificar las muestras como positivas, negativas o indeterminadas para VIH-1 fueron las siguientes: mínimo 2 bandas reactivas, como por ejemplo las bandas de los péptidos de la envoltura (gp160, gp41) (Bandas 4 y 6) o al menos 1 péptido de la envoltura y la proteína Gag (p24) (Banda 5) o el péptido de la polimerasa (p31) (Banda 3). Por último, un resultado se clasificaría como indeterminado si se obtuviera 1 péptido de la envoltura, o las bandas 3 y 5 juntas o cada una por separado (**Tabla 3.4**)

En el caso del VIH-2, se requiere la reactividad de ambas bandas (gp36 HIV-2 ENV y gp140 HIV-2 ENV) para considerar un resultado positivo; para un resultado negativo no debe aparecer ninguna banda. En el caso de que aparezca únicamente una banda, el resultado se clasificaría como indeterminado.

Tabla 3.4 Criterio de interpretación de los resultados de VIH-1 y VIH-2 de *Geenius* según la combinación de bandas.

	Bandas VIH-1		
	Opción 1	Opción 2	Opción 3
VIH-1 Positivo	gp160 + gp41	gp160 + p31	gp160 + p24
		gp41 + p24	gp41 + p31
VIH-1 Negativo	Ninguna Banda	BC + 1 banda env	BC + 1 banda
VIH-1 Indeterminado	A) gp160 ó gp41 con: p24 ó p31; B) p24 + p31		

	Bandas VIH-2
VIH-2 Positivo	gp36 + gp140
VIH-2 Negativo	Ninguna banda
VIH-2 Indeterminado	gp36 ó gp140

Tabla 3.5 Características principales de las técnicas serológicas para la detección de la infección por VIH.

	COBAS	MINIVIDAS	GEENIUS
Tipo de técnica	Inmunoensayo	Inmunoenzimática + ELFA	Inmunoensayo
Ag p24	Sí	Sí	Sí
VIH-1	Sí	Sí	Sí
VIH-2	Sí	Sí	Sí
Grupos M, N, O, P	M, O	M, O	M, O

3.5 Carga Viral

Para la cuantificación de la carga viral del VIH se compararon dos técnicas de RT-PCR: *GeneXpert® HIV-1 Viral Load (Cepheid) and COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)* y dos métodos de elución de la sangre seca.

En primer lugar, se descongeló un punto de sangre del congelador a -80°C y se procedió a la elución del disco de papel de filtro. Se usaron diferentes condiciones para

llevar a cabo la extracción de sangre seca de cada punto de sangre, y obtener el eluido con el que se realizó la carga viral:

- **Condiciones A:** Inoculación de un punto de sangre seca en 1.5 mL de *buffer* de lisis *NucliSENS EasyMag* durante dos horas a temperatura ambiente y agitación suave (n=60)
- **Condiciones B:** Inoculación de un punto de sangre activo *SPEX (Specimen Pre-Extraction Reagent; ref: P/N: 06989861190, Roche)* incubado en 1.2mL de *SPEX* a 56°C durante 10 minutos, y con agitación intermitente al principio, en mitad y al final de la incubación (n=362).

3.5.1 **GeneXpert® HIV-1 Viral Load (Cepheid)**

Se trata de una técnica que realiza la extracción de ácidos nucleicos, amplificación, detección y cuantificación de la carga viral del VIH-1 mediante RT-PCR cuyo límite de detección es de 40 cp/dot en muestras de sangre seca. Se encuentra diseñado para la detección del VIH-1 pero no para VIH-2; puede detectar y cuantificar VIH del grupo M (subtipos A, B, C, D, F, G, H, I, J, K *CRF01_AE*, *CRF02_AG* y *CRF03_AB*), grupo N y grupo O. No es una técnica de screening y tampoco está considerada para la confirmación del diagnóstico, sino para la prognosis y monitorización de la carga viral. Es sencilla de utilizar ya que solo precisa de un ordenador asociado al sistema *GeneXpert®* con el software incorporado y los cartuchos específicos para llevar a cabo la prueba; con la ventaja de que, al ser cartuchos ya cargados con los reactivos, reduce al mínimo las posibles contaminaciones biológicas.



Figura 3.10 Equipo *GeneXpert® HIV-1 Viral Load (Cepheid)*.

Se procesaron 116 muestras de pacientes adultos mediante *GeneXpert® HIV-1 Viral Load (Cepheid)* para obtener la carga viral. Al menos 1 mL del eluido se transfería a un cartucho de VIH específico y se procedía a cargarlo en el equipo. La duración de la prueba era de 90 minutos. Si el volumen usado era inferior a 1mL la prueba se clasificaba directamente por el equipo como inválida debido a un volumen insuficiente.

3.5.2 COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)

Se trata de un test de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* para la cuantificación de VIH-1. La sensibilidad analítica llega a cuantificar hasta 20 cp/dot. Dicho equipo se puede usar para evaluar la prognosis de un paciente o monitorizar los efectos de los antirretrovirales durante el tratamiento antirretroviral.

No se puede usar como una técnica de diagnóstico o para la confirmación de la infección de VIH-1. Para llevar a cabo la carga viral con este equipo, se usó 1,1 mL del eluido de cada muestra y se inoculó en los *eppendorf* específicos del COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche), que a su vez debían introducirse en los racks apropiados para incorporarlos al equipo para realizar la extracción automática de ARN. Posteriormente, el producto final obtenido se transfirió al equipo COBAS Taqman para la amplificación y detección de la diana. Se trata de una RT-PCR a tiempo real que detecta 2 dianas diferentes del genoma del VIH-1 (gag y LTR), las cuales no están sujetas a la presión selectiva de los fármacos.



Figura 3.11 Equipo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche).

Tabla 3.6 Características de las técnicas de cuantificación viral de VIH-1.

	COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)	GeneXpert® HIV-1 Viral Load (Cepheid)
Tipo de técnica	RT-PCR	RT-PCR
Límite de detección (Plasma)	20 cp/mL	40 cp/ml
Límite detección (DBS)	20 cp/dot	40 cp/dot
Duración de la técnica	3horas y 5 minutos	90 minutos
Volumen de muestra usado	850µL*	1000µL
VIH-1	Sí	Sí
VIH-2	No	No
Grupos M, N, O, P	M, O	M, N, O

* Volumen inoculado: 1,1mL

3.6 Caracterización molecular del VIH

En el laboratorio de Microbiología de la CUN hay 4 áreas bien diferenciadas para la realización de las distintas etapas previas a la secuenciación y una quinta área que se encuentra en el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra: en el área 1 se lleva a cabo la preparación de las mezclas de reactivos necesarias para las reacciones de amplificación y secuenciación; el área 2 es el área de la extracción del material genético y el área de la preparación de la primera PCR; el área 3, es donde se realiza la preparación de la segunda PCR y el área 4 es donde se encuentra el termociclador necesario para la amplificación y, por último, el área 5 es el área de secuenciación, que se encuentra en el CIMA.

3.6.1 Dianas de detección y *primers*

A continuación, se pueden observar los *primers* usados en este estudio para la amplificación de las dianas de detección: RT, proteasa e integrasa (**Tabla 3.7 a Tabla 3.9**).

Tabla 3.7 Pares de primers VIH-1 para la amplificación de la región de la Transcriptasa Inversa (RT).

Nombre Primer	Región en VIH-1	Secuencia	*Posición
ORT1	RT	TTYAGRGARCTYAATAARAGAACTCA	2777-2803
ORT2	RT	CCTCITYTTGCATAYTTYCCTGTT	3599-3623
ORT3	RT	TTYTGGGARGTYCARYTAGGRATACC	2808-2833
ORT4	RT	GGYTCTTGRTAAATTTGRTATGTCCA	3558-3583

* ORT1 (*forward* externo); ORT2 (*forward* interno); ORT3 (*forward* interno); ORT4 (*reverse* interno); * Cepa de referencia: HXB2; N.º GenBank: K03455 M38432.

Tabla 3.8 Pares de primers VIH-1 para la amplificación de la región de la proteasa (PR).

Nombre Primer	Región en VIH-1	Secuencia	*Posición
OPR1	PR	TGAARGAITGYACTGARAGRCAGGCTAAT	2057-2085
OPR2	PR	AYCTIATYCCTGGTGTTCATTRTT	2955-2979
OPR3	PR	YTCAGRCAGRCCRGARCCAACAGC	2135-2159
OPR4	PR	CTGGTGTTCATTRTTKRTACTAGGT	2945-2970

* OPR1 (*forward* externo); OPR2 (*reverse* externo); OPR3 (*forward* interno); OPR4 (*reverse* interno); * Cepa de referencia: HXB2; N.º GenBank: K03455 M38432.

Tabla 3.9 Pares de primers VIH-1 para la amplificación de la región de la integrasa (INT).

Nombre Primer	Región en VIH-1	Secuencia	*Posición
INPS1_CUN	INT	TAGTAGCCAGYTGTGATAAATGYC	4335-4359
INPR8_CUN	INT	TTCCATGTTCTAATYCTCATCCTG	5082-5105
INPS3_CUN	INT	GAAGCCATGCATGGACAAG	4371-4389
INPR9_CUN	INT	ATYCTCATCCTGTCTACYTGCC	5062-5093

INPS1_CUN (*forward* externo); INPR8_CUN (*reverse* externo); INPS3_CUN (*forward* interno); INPR9_CUN (*reverse* interno); * Cepa de referencia: HXB2; N.º GenBank: K03455 M38432.

3.6.2 Elución y extracción de ácidos nucleicos

Se usó el Kit de extracción *High Pure Viral Nucleic Acid* (ref:11858874001, Roche) realizándose la técnica según las instrucciones del fabricante adaptado nuestras condiciones optimizadas (**Anexo II-Protocolo de elución y extracción de ácidos nucleicos**). Este método se basa en el uso de la centrifugación y el uso de membranas de sílice gel capaces de unir selectivamente ARN. La lisis de la muestra se realizaba bajo condiciones desnaturalizantes para inactivar las *ARNasas*. Para aumentar el rendimiento de la extracción, el *buffer* de lisis incluía un *carrier* de ARN.

Se usaron dos puntos de sangre seca que fueron digeridos y sujetos a extracción manual de ácidos nucleicos. Los puntos de sangre fueron incubados en un *ependorf* con 500 μ L de *buffer ATL* (*buffer* de lisado tisular) a una temperatura de 85°C durante 10 minutos para la lisis de la muestra. Posteriormente a la incubación se añadieron 50 μ L de *Proteinasa K* en el mismo *ependorf* y se volvió realizar una incubación a una temperatura de 56°C durante 60 minutos. Después se inocularon 253 μ L de *buffer* de lisis a ese mismo *ependorf* y se incubaron a 72°C durante 10 minutos. Finalmente, se añadieron 100 μ L más de *binding buffer*, homogeneizamos y comenzamos con la purificación de los ácidos nucleicos siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez terminada la purificación, se pudo comenzar con el estudio genotípico.

3.6.3 Retrotranscripción

Para comenzar con el estudio genotípico se realizó la retrotranscripción del ARN extraído transformación del ARN en ADNc. La reacción de ADNc puede llevarse a cabo como una reacción individual o como una serie de reacciones paralelas con diferentes moléculas de ARN. Por tanto, la mezcla de la reacción puede ser preparada combinando reactivos individualmente o creando una máster mix que contenga todos los componentes. La reacción se realizó en termociclador *Perkin Elmer 9700*. Se transferían 20 μ L de ARN extraído a la máster mix de ADNc preparada previamente siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniendo al final un volumen de 40 μ L. El protocolo seguido para esta reacción era del kit *ThermoScientific Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (*ThermoFisher*, ref: K1632). Los componentes y volúmenes de la *Máster mix* utilizada pueden verse en detalle en la **Tabla 3.10**.

Tabla 3.10 Componentes de Máster mix volúmenes y concentraciones.

Componente:	Concentración reactivo	[reacción]	Volumen
Random Hexamer Primer, (120µL)	100µM	5µM	2µL
Nuclease-free water. (2x1,25mL)	-	-	2µL
5X Reaction Buffer, (500µL)	5X	1X	8µL
RiboLock RNase Inhibitor, (120µL)	20 U/µL	20 U	2µL
dNTP Mix, (250µL)	10mM	1mM	4µL
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (120µL)	200 U/µL	200 U	2µL
RNA muestra		-	20µL
TOTAL	-	-	40µL

3.6.4 *Nested RT-PCR*

Es una variante de la PCR convencional que consiste en dos rondas de amplificación con dos pares de *primers* (**véase sección 3.6.1**) diferentes para incrementar la sensibilidad y especificidad de detección. Primero, con la pareja de *primers* externos se realiza una reacción para amplificar una región extensa del ADN que incluye las dianas que queremos.

Posteriormente, con la pareja de *primers* internos y el producto amplificado de la reacción anterior, se amplifica una región interna. Los *primers* que se usaron pertenecen a un protocolo publicado por la Agencia Nacional Francesa para la Investigación de SIDA (ANRS) y la Organización Mundial de la Salud. Las *RT-PCR* se realizaron con el termociclador *Perkin Elmer 9700*.

Se llevó a cabo para la determinación de las mutaciones de resistencia frente a los antirretrovirales: inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos/análogos de nucleósidos (ITIANs), no nucleosídicos/no análogos de nucleósidos (ITINANs), inhibidores de la proteasa (IPs) e inhibidores de la integrasa (INIs).

Optimización de la PCR

Se realizaron pruebas para optimizar la amplificación de las dianas de interés (RT, PR, INT) de la RT-PCR mediante la adquisición de una nueva enzima *KAPA BIOSYSTEMS*, y se llevaron a cabo reacciones paralelas con variación en las condiciones de temperatura, duración, ciclos y concentración de los componentes y termocicladores respecto a la *TaqGold polimerasa*. Los termocicladores que se utilizaron fueron *Perkin Elmer 9700* y *CFX-96* (**Figuras 3.12 y 3.13**).

En primer lugar, se realizaron pruebas de amplificación con la integrasa. Se realizó con la enzima *KAPA Taq HotStart* (*Sigma-Aldrich Co. LLC*) y siguiendo el protocolo establecido por el fabricante para llevar a cabo la reacción (**Tabla 3.13**). Sin embargo, se quiso comprobar si la concentración de los componentes era suficiente en comparación con la *TaqGold* polimerasa. Por ello se hicieron 4 reacciones con diferentes condiciones (**Tabla 3.11**) modificando la concentración de *DNTPs* y *Mg₂Cl*. Dichas reacciones se realizaron en el termociclador *Perkin Elmer 9700 Applied Biosystems*.



Figura 3.12 Equipo *Perkin Elmer 9700 Applied Biosystems*.



Figura 3.13 Equipo *CFX96-Real System C1000 Thermal Cycler*.

Al mismo tiempo se realizaron las reacciones con la enzima *TaqGold* siguiendo el protocolo establecido por la OMS y ANRS (**Tabla 3.12**). A diferencia de la *TaqGold* polimerasa, el protocolo para preparar la máster mix de *KAPA Taq HotStart* conlleva una preparación más sencilla debido a que viene un preparado de mix, compuesto por: *KAPA2G DNA Polymerase*, *MgCl₂* y *DNTPs*; se completa la mix de PCR añadiendo los *primers* de integrasa. Posteriormente se llevaron a cabo las mismas reacciones, muestras y condiciones de ambos protocolos, pero en el termociclador *CFX96-Real System C1000 Thermal Cycler*. Una vez realizadas las pruebas con la integrasa se siguió con el mismo procedimiento con la retrotranscriptasa y la proteasa.

Tabla 3.11 Condiciones utilizadas para la optimización de la *RT-PCR* con la enzima KAPA.

Máster Mix	Condiciones normales (OMS)	Condiciones A (Condiciones Normales KAPA)	Condiciones B	Condiciones C
D H ₂ O	10uL	9 uL	8uL	7uL
KAPA2GDNA Polymerase MgCl ₂ DNTPs	25uL	25uL	25uL + 1uL DNTPs	25uL + 2uL MgCl ₂

Tabla 3.12 Condiciones de amplificación de PR, RT, INT para la *RT-PCR* con TaqGold.

PCR 1º paso PROGRAMA VIH-1-OMS User: Genotype 4h		PCR 2ºpaso PROGRAMA VIH-2-OMS User: Genotype 3h	
10 min a 95°C		10 min a 95°C	
40 ciclos de	30 seg 94°C 30 seg 53°C 2' 30" 72°C	35 ciclos de	20 seg 94°C 30 seg 53°C 2' 30" 72°C
10 min a 72°C		10 min a 72°C	
Enfriamiento a 4°C		Enfriamiento a 4°C	

Tabla 3.13 Condiciones de amplificación de PR, RT, INT para la RT-PCR con KAPA Biosystem.

PCR 1º paso		PCR 2º paso	
User: Genotype		User: Genotype	
PROGRAMA VIH-1-OMS-KAPA 2h		PROGRAMA VIH-2-OMS-KAPA 1.5h	
5 min a 95°C		5 min a 95°C	
40 ciclos de	15 seg 95°C 15 seg 55°C 30 seg 72°C	35 ciclos de	15 seg 95°C 15 seg 55°C 30 seg 72°C
1 min a 72°C		1 min a 72°C	
Enfriamiento a 4°C		Enfriamiento a 4°C	

3.6.5 Secuenciación

El proceso de secuenciación se realizó en la unidad de secuenciación del CIMA, concretamente. La secuenciación de los fragmentos codificantes se realizó para la Transcriptasa inversa (RT), Proteasa (PR) y la Integrasa (INT) para evaluar la presencia de mutaciones de resistencia frente a antirretrovirales en los pacientes con nuevo diagnóstico VIH positivo y aquellos con fallo virológico.

3.6.5.1 Purificación del ADN previa a la secuenciación

La purificación se llevó a cabo para mejorar los resultados de la reacción de secuenciación ya que consigue eliminar restos de iniciadores, nucleótidos, enzimas y sales. Para ello, se llevó a cabo la purificación de los fragmentos amplificados mediante el kit *GE HealthCare (GFX PCR DNA, Gel Band Purification Kit; ref: 289034700L/AE)*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Esta técnica emplea un sistema de columnas que unen selectivamente el ADN gracias a una membrana de sílice gel capaz de retener el ácido nucleico. La adsorción del ADN a las columnas de sílice gel se produce en presencia de alta concentración de sales caotrópicas.

Brevemente, la purificación se realizó sobre el producto obtenido en la PCR, añadiendo 500µL de buffer de captura en una columna de purificación y se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 segundos. El producto filtrado se desechó y se añadieron 500µl de buffer de lavado a la misma columna y centrifugando a su vez a 13.000 rpm durante 30 segundos. Se descartó el producto filtrado de nuevo y finalmente se añadieron 50µl del buffer de elución. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm. El producto filtrado (Amplicón) se guardó a una temperatura de 4°C antes de mandarlo a secuenciar.



Figura 3.14 Kit *GE HealthCare* para purificación de bandas de amplificación de geles.

3.6.5.2 Reacción de Secuenciación

La secuenciación se realizó mediante el método enzimático de síntesis abortiva o de los dideoxinucleótidos marcados con *BigDye* (*ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing v.3.1 Kit*, *Perkin-Elmer Applied Biosystems*). En esta reacción se incorporan los nucleótidos habituales (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), así como sus correspondientes 2'-3'-dideoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP), cada uno de estos últimos marcados con una molécula emisora de fluorescencia a una longitud de onda distinta (rojo, amarillo, verde y azul). Estos dideoxinucleótidos carecen de radical hidroxilo en posición 3', impidiendo la adición de más nucleótidos a la cadena cuando ellos se incorporan. De esta manera, tiene lugar la polimerización en sentido 5'-3', hasta la incorporación de estos *ddNTP*, produciéndose cadenas de longitud variable acabadas en cada uno de ellos. Para la obtención de la secuencia sentido, se inocularon 10-20 ng del producto obtenido en la PCR junto con la mezcla compuesta por 2 µl del reactivo *BigDye*, 1 µl del *primer* interno *sense* a 5µM y hasta 15 µl de agua *miliQ*. Para obtener la secuencia antisentido, se cambia el *primer* interno *sense* por el *antisense*. Esta mezcla se sometía a la reacción de polimerización en el termociclador 9800 *Fast Thermal Cycler* aplicando 35 ciclos con una temperatura de anillado (*annealing*) de 50°C y 60°C para la extensión.

Tras la reacción enzimática, los productos generados se someten a electroforesis, lo cual permite deducir la secuencia problema a partir del electroferograma generado tras la detección y análisis de las bandas de secuenciación en el secuenciador automático. En la **Figura 3.15** se muestra un ejemplo de electroferograma, en el que cada pico corresponde a un nucleótido diferente.

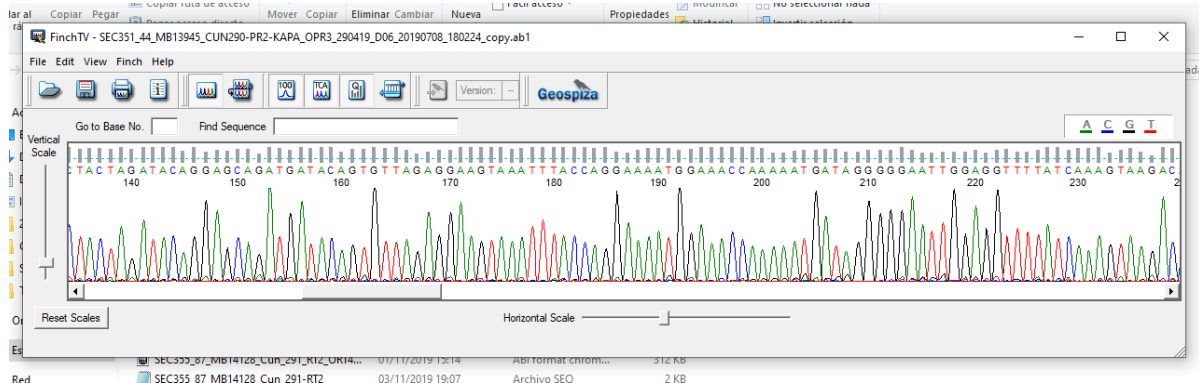


Figura 3.15 Electroferograma correspondiente a secuencia del fragmento de proteasa del virus VIH-1.

Interpretación de resultados

Para finalizar la secuenciación se debe estudiar la calidad y alinear las secuencias obtenidas. Se editaron con el programa *Finch tv software* y se alinearon con el software *Clustal Omega*. Este software integra los 4 electroferogramas obtenidos para cada región secuenciada (PR, RT e INT) y para cada dirección (5' y 3'). Tras llevar a cabo la asignación de las bases o *base calling* se puede visualizar la secuencia correspondiente a cada una de las regiones y direcciones previamente mencionadas. Después de revisar la calidad de las secuencias se precisa la combinación de las direcciones 5' y 3' de cada región secuenciada e intentar combinar las regiones unas con otras.

Posteriormente se enfrentan las secuencias con una cepa de referencia que no tenga mutaciones de resistencia, por ello se usaron los programas *Geno2pheno* y *Stanford HIV Database* que realizan estas comparaciones y proporcionan la información. Se describen en el siguiente apartado.

Una vez se tienen las secuencias se revisan las posiciones que no coinciden con la secuencia de referencia lo que indica que existen posibles mutaciones. Para finalizar se exportan las secuencias en formato *FASTA* o de texto para trabajar con ellas con otros algoritmos de interpretación y análisis de mutaciones.

3.6.5.3 Subtipado

La determinación de las cepas circulantes se llevó a cabo mediante técnicas moleculares y con la herramienta informática *Geno2Pheno* (<http://www.geno2pheno.org/>). Es un programa en el cual se pueden introducir las secuencias obtenidas y compararlas con otras secuencias obteniendo así el subtipo más probable de VIH-1. Las secuencias se introducen en una casilla concreta (**Figura 3.16**).

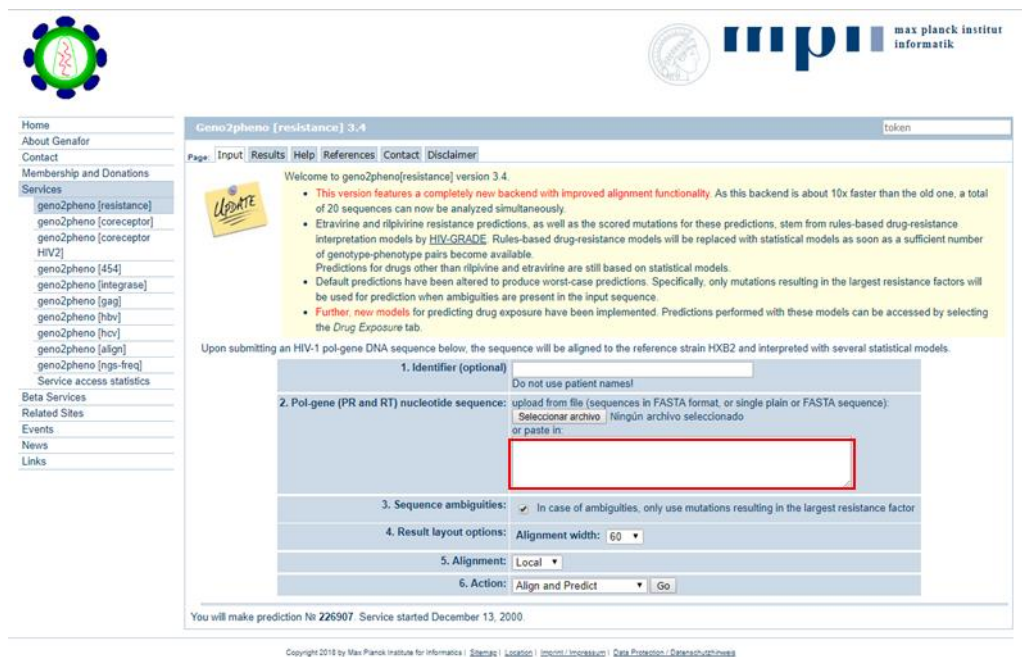


Figura 3.16 Página principal *Geno2Pheno* para introducir de las secuencias.

Una vez introducida la secuencia o secuencias y analizadas, *Geno2Pheno* proporciona unos resultados en los que se puede obtener el subtipo más probable al que puede pertenecer dicha secuencia y por tanto la cepa infectante (**Figura 3.17**).

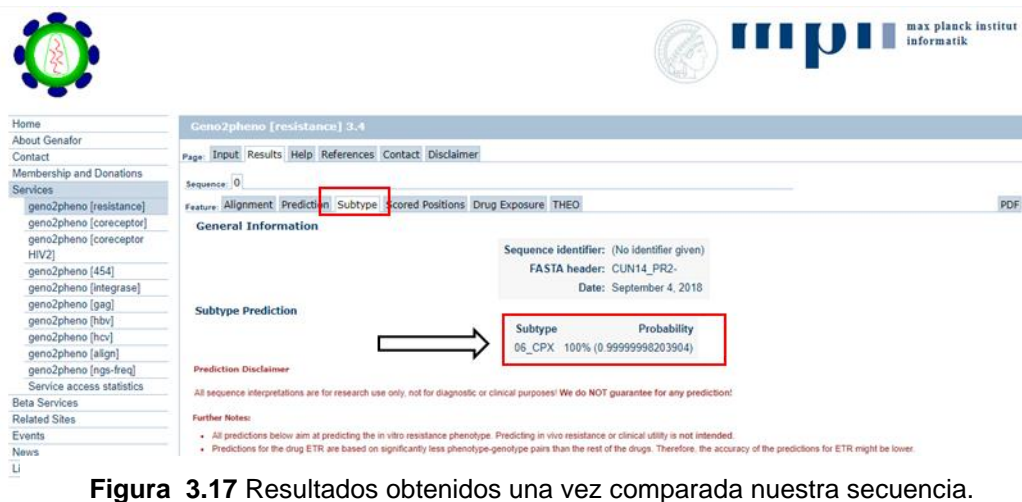


Figura 3.17 Resultados obtenidos una vez comparada nuestra secuencia.

Además, proporciona el fenotipo virtual de la resistencia a los fármacos de los genotipos del VIH-1 asociado a la resistencia de los inhibidores proteasa y retrotranscriptasa.

Además, se realizó el análisis filogenético de las muestras mediante la herramienta el *software* MEGA6, con el modelo de sustitución nucleotídica Tamura-3-parámetros y un re-muestreo tipo bootstrap con 1.000 repeticiones.

Se realizó en el laboratorio Epidemiología Molecular, del Departamento de Microbiología y Parasitología en la Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS and CIBEREsp-RITIP, Madrid.

3.6.5.4 Mutaciones de Resistencia

La determinación de las mutaciones de resistencia frente a los antirretrovirales se hizo mediante la base de datos de la Universidad de Stanford y la Agencia Nacional Francesa para la investigación del SIDA. La base de datos de resistencia a los fármacos de *Stanford (HIVDB)* (<http://hivdb.stanford.edu>), permite introducir secuencias modificadas por los usuarios que quieran usar la plataforma. Esta plataforma de Stanford nos proporciona niveles inferidos de resistencia frente a los antirretrovirales más comunes como ITIANs, ITINANs, Inhibidores de la Proteasa (IPs) e Inhibidores de la Integrasa (INIs). Además, muestra la interpretación de las mutaciones halladas y las posibles implicaciones que tienen dichas mutaciones en el tratamiento.

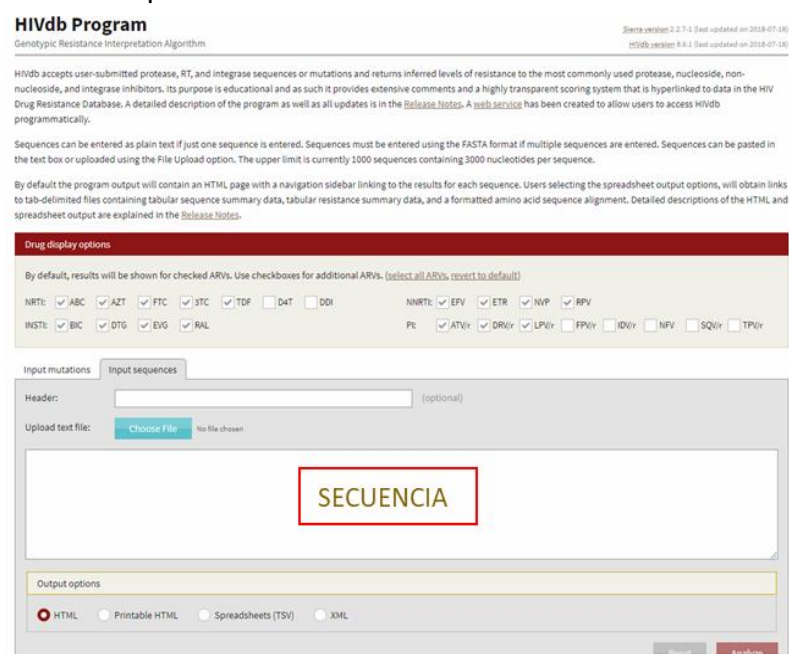


Figura 3.18 Vista de la página principal de la base de datos de Stanford para mutaciones de resistencia.

Las secuencias que se quieren analizar para averiguar si se han desarrollado mutaciones de resistencia se introducen en una casilla específica, subiendo el archivo donde se encuentra dicha secuencia o pegándola directamente en el espacio destinado a ella (**Figura 3.18**). Una vez se han introducido la secuencias o secuencias, la herramienta las analiza y muestra unos resultados para cada una de ellas (**Figura 3.19**).

Los resultados muestran las mutaciones de resistencia que esa cepa infectante ha desarrollado o adquirido, frente a los antirretrovirales a los que puede ser sensible o resistente e información descriptiva de las mutaciones que puedan haber sido detectadas. También proporciona información acerca de un probable subtipo y los codones en los que se encuentra dicha secuencia analizada.

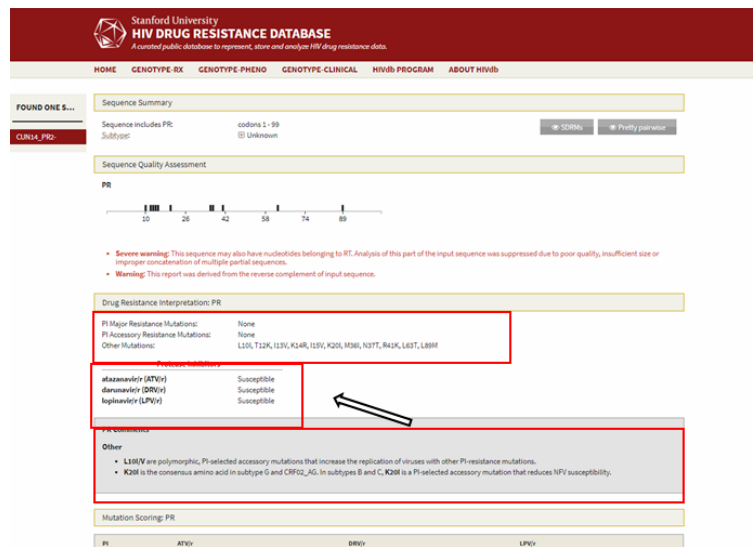


Figura 3.19 Información acerca de las mutaciones de resistencia, susceptibilidad a antirretrovirales y subtipo probable.

3.7 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico Stata 15.0. Se realizó un análisis descriptivo para examinar las características demográficas y clínicas y los datos del TAR. Se calcularon la media, la mediana y el rango intercuartil (IQR) para las variables cuantitativas y se analizaron los porcentajes para las variables cualitativas. Se comparó la prevalencia de infección por VHA, VHB, VHC, HTLV y Sífilis en participantes VIH+ y VIH- mediante el test de Fisher.

Se realizaron modelos de correlación de la variable cuantitativa de carga viral del *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)* vs *GeneXpert® HIV-1 Viral Load (Cepheid)* y la correlación entre las variables cuantitativas de los métodos de elución de *Roche- SPEX vs Buffer lysis EasyMag*.

Por otro lado, se realizaron modelos de regresión logística multivariante para estudiar la asociación entre: 1) la capacidad de tomar la medicación ARV y la aparición de las mutaciones K103N o M184V/I; 2) el olvido de la toma de medicamentos ARV y la presencia de K103N o M184 V/I; 3) el olvido de tomar el tratamiento ARV y la carga viral del VIH; 4) no tener una buena capacidad para tomar el tratamiento ARV y la carga viral del VIH; 5) saltarse dosis de ARV y la carga viral del VIH.

Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

3.8 Aspectos éticos

Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito para participar en este estudio, previamente aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Kinshasa (RDC) y la Universidad de Navarra (Pamplona, España). En el caso de los menores de edad (15-17 años, no casados) firmaba la persona responsable de los mismos. Se les explicó de manera clara el objetivo, el proceso del estudio a realizar y las consecuencias del mismo.

La participación fue voluntaria. La identificación de los cuestionarios y las muestras biológicas se codificó para que los datos del paciente permanezcan anonimizados, de manera que el análisis de los datos no plantee problemas de confidencialidad. Las personas responsables del registro de datos y del trabajo de laboratorio firmaron una hoja en la que aceptaban guardar la confidencialidad de los datos de los participantes.

4 RESULTADOS

4.1 Características de la población de estudio.

Se recogieron muestras de 365 participantes. La mayoría eran mujeres (64%) y la edad media fue de 41,4 (DE: 13.4) años. Se obtuvieron un total de 280 (77%) muestras de pacientes VIH-1 positivos, 23 (6%) muestras clasificadas como indeterminadas y 62 (17%) muestras negativas que se utilizaron como grupo de control negativo.

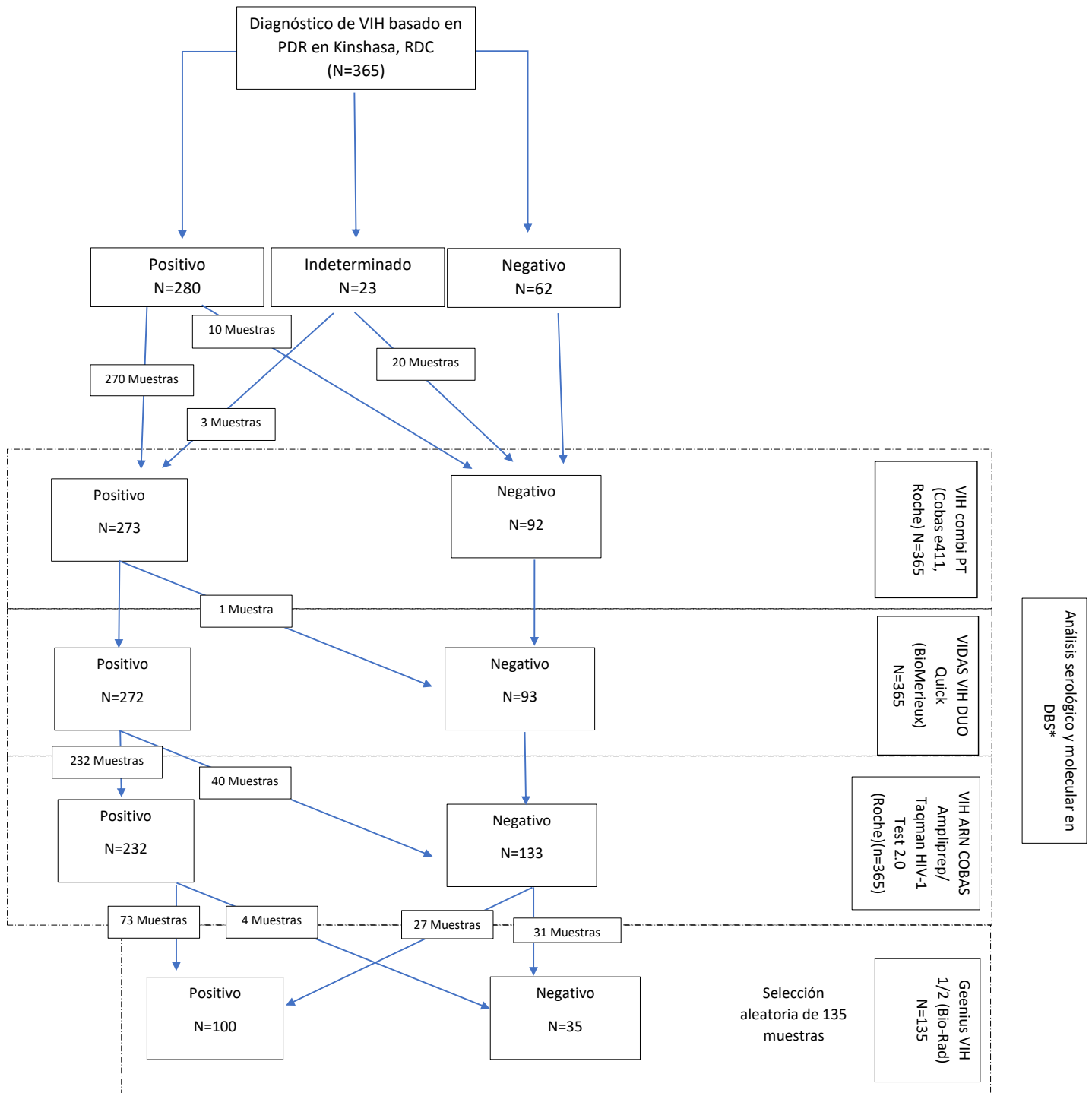
Entre los participantes con un diagnóstico VIH positivo o indeterminado en el origen, en relación con el tratamiento antirretroviral, 107 (29,3%) eran nuevos diagnósticos naïve, 162 (44,4%) estaban en tratamiento antirretroviral (ARV), y no se disponía de datos para los 33 (9,1%) restantes. Los regímenes se basaron casi exclusivamente en ITIANs e ITINANs; la combinación más utilizada fue AZT+3TC+NVP como terapia de primera línea y TDF+3TC+EFV, principalmente como tratamiento alternativo.

4.2 Diagnóstico serológico a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa

4.2.1 Diagnóstico serológico VIH mediante técnicas de *Elecsys® COBAS e411 (HIV COMBI PT Roche)* y *VIDAS® HIV Duo Quick (bioMérieux)*

En España, un total de 365 muestras de DBS fueron analizadas simultáneamente con los ensayos serológicos de *Elecsys® COBAS e411 (HIV COMBI PT Roche)* y *VIDAS® (VIDAS HIV Duo Quick, Biomerieux)*. A continuación, se puede ver el flujo de trabajo realizado con las muestras de DBS estudiadas (**Figura 4.1**).

Se obtuvieron mediante *Elecsys® COBAS e411 (HIV COMBI PT Roche)* 273 (74,8%) muestras de DBS positivas (mediana de COI: 268, RIC: 112-763) y 92 muestras negativas (25,2%) (mediana del COI: 0,234, RIC: 0,203-0,287). Por otro lado, los análisis mediante *VIDAS® HIV Duo Quick (bioMérieux)* resultaron positivos para 272 (74,5%) muestras de DBS (mediana VT: 20,2; RIC: 14.6-25.4), mientras que 93 muestras (25,5%) fueron negativas (mediana VT: 0,16; RIC: 0.15-0.17). La sensibilidad de ambos inmunoensayos fue del 100%. Sin embargo, la especificidad de *Elecsys® COBAS e411 (HIV COMBI PT Roche)* fue menor (98,9%) debido a un resultado falso positivo (**Tabla 4.1**)



*No se encontró ningún resultado indeterminado con análisis serológico o molecular de DBS

Figura 4.1 Resumen del diagnóstico de VIH a través de PDR y análisis de DBS de pacientes atendidos en Kinshasa (RDC).

Tabla 4.1 Resultados resumidos para el diagnóstico serológico del VIH en España a partir de muestras de DBS de Kinshasa (RDC), a través de ensayos analíticos para el diagnóstico del VIH en DBS.

		<i>Elecsys® VIH combi PT (Roche)</i> (n=365)		<i>VIDAS® VIH Duo Quick (BioMérieux)</i> (n=365)		<i>Geenius VIH 1/2 ensayo confirmatorio (Geenius, Bio-Rad, USA)</i> (n=135)	
		+	-	+	-	+	-
PDR (n=365)	+ (n=280)	270	10	269	11	97	15
	ID (n=23)	3	20	3	20	3	20
	- (n=62)	0	62	0	62	0	0
S		100% (98.6 - 100)		100% (98.6 - 100)		91,7% (84.9 - 96.1)	
E		98,9% (94.1-99.9)		100% (96.1 - 100)		100% (86.8 - 100)	
VPP		99,6% (97.9 - 99.9)		100% (98.6 - 100)		100% (96.4 - 100)	
VPN		100% (96.1 - 100)		100% (96.1 - 100)		74,3% (56.7 – 87.5)	

PDR: Prueba de Diagnóstico Rápido; S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo.

4.2.2 Diagnóstico serológico VIH mediante test *Geenius VIH 1/2* (*Geenius, Bio-Rad, EE. UU*)

Para el ensayo confirmatorio *Geenius VIH 1/2* (*Geenius, Bio-Rad, EE. UU.*), 135 (36,9%) de los 365 DBS recogidos fueron seleccionados aleatoriamente y analizados. Entre ellos, 100 (74,1%) obtuvieron un diagnóstico positivo de VIH-1 (principalmente debido a la presencia de anticuerpos contra los antígenos gp-160 y gp-41), y 35 (25,9%) fueron negativos. Entre las 100 muestras de pacientes VIH-1 positivos, el 100% fueron positivas por *Elecsys® VIH combi PT* (*Roche*) y *VIDAS® HIV Duo Quick* (*bioMérieux*). Sin embargo, entre las 35 muestras de pacientes VIH-1 negativos un 25,7% (9/35) fueron VIH-1 positivas por *Elecsys® VIH combi PT* (*Roche*) y *VIDAS® HIV Duo Quick* (*bioMérieux*) (**Tabla 4.1**). Los resultados obtenidos dependían del antígeno y del tipo de VIH. Los dos primeros antígenos del ensayo representan al VIH-2, con los antígenos ENV gp36 y ENV gp140, ambos fueron negativos para todas las muestras, no se detectó el VIH-2 en ninguna muestra. Sin embargo, los antígenos del VIH-1 (líneas 3-6) POL 31, ENV gp160, GAG_p24 y ENV gp41 fueron reactivos dependiendo de la muestra analizada (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2 Datos de intensidad de banda del *Geenius VIH 1/2* (*Geenius, Bio-Rad, EE. UU.*)

		No reactivo (%)	Baja intensidad (%)	Alta intensidad (%)
VIH-1	Línea 3_HIV1 POL_p31	128 (94,8%)	7 (5,2%)	0 (0%)
	Línea 4_HIV1 ENV_gp160	36 (26,7%)	74 (54,8%)	25 (18,5%)
	Línea 5_HIV1 GAG_p24	89 (66%)	18 (13,3%)	28 (20,7%)
	Línea 6_HIV1 ENV_gp41	30 (22,2%)	15 (11,1%)	90 (66,7%)
VIH-2	Línea 1_HIV2 ENV_gp36	135 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
	Línea 2_HIV2 ENV_gp140	135 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

4.2.3 Diagnósticos erróneos en la República Democrática del Congo

Los análisis realizados en Kinshasa proporcionaron un alto porcentaje de falsos positivos al analizar las muestras de DBS. De los 280 casos VIH-1 positivos, 23 indeterminados y 62 casos VIH-1 negativos según el análisis realizado mediante las PDR en Kinshasa, mediante las técnicas serológicas de *Elecsys® VIH combi PT (Roche)* y *VIDAS® VIH Duo Quick (BioMérieux)* se identificaron 272 casos (74.5%) VIH-1 positivos y 93 (25.5%) VIH-1 no infectados. Identificamos once muestras como falsos positivos, (3.3%) según el algoritmo de diagnóstico serológico con PDR utilizado en la República Democrática del Congo, Estas 11 muestras procedían de 9 pacientes dado que un participante se estudió en tres puntos diferentes con tres muestras de DBS diferentes, Se trataba de un varón de 31 años diagnosticado VIH-1 positivo erróneamente en 2016.

La mayoría de los pacientes estaban recibiendo TAR cuando se llevó a cabo la recolección de muestras de DBS (TAR entre 3 y 20 años de duración). La **Tabla 4.3** muestra en detalle los datos de los 9 participantes estudiados en nuestra serie que correspondían al diagnóstico erróneo de VIH y falsos positivos en Kinshasa.

Tabla 4.3 Características y resultados detallados de las pruebas de los participantes con un diagnóstico erróneo local falso positivo (n = 9).

ID	Datos del paciente						Serología			ARN
	Fecha de diagnóstico	Edad (años)	Sexo	CD4 (cél/mm3)	TAR	Duración TAR (años)	VIH Serología Elecsys Roche	VIH Serología VIDAS Biomerieux	Geenius VIH 1/2 Bio-Rad	Carga viral Roche
CUN41	2007	-	-	-	Sí	11,9	neg	neg	No realizado	neg
CUN84	1992	27	M	234	Sí	19,2	Positivo (2.05 COI)	neg (VT: 0,17)	neg (sin bandas)	neg
CUN 99	-	-	-	-	-	-	neg	neg	neg	neg
CUN117	2016	30	M	669	Sí	4,5	neg	neg	No realizado	neg
CUN130	-	45	M	268	Sí	5,3	neg	neg	No realizado	neg
CUN136	2017	69	F	898	-	-	neg	neg	No realizado	neg
CUN182	2016	31	M	1029	Sí	4,4	neg	neg	neg	neg
CUN200	2012	62	F	436	Sí	4,2	neg	neg	No realizado	neg
CUN345	2012	32	F	-	-	3,2	neg	neg	neg	neg

*Neg: negativo

4.2.3.1 Análisis de muestras con resultado VIH indeterminado en la República Democrática del Congo

De las 365 muestras, se clasificaron en el origen como muestras indeterminadas 23 DBS (6,3%) debido a la discordancia entre los resultados de las PDR en Kinshasa, RDC. Veinte (87%) de estas muestras previamente clasificadas como indeterminadas en el origen fueron clasificados como individuos no infectados por VIH-1 después del análisis de las muestras DBS en España, dando negativo en todas las pruebas serológicas como en la cuantificación de la carga viral. Sin embargo, las 3 (13%) muestras restantes sí que correspondieron a pacientes infectados por el VIH-1 y tenían carga viral detectable de acuerdo al análisis del DBS, pero solo uno de los pacientes (mujer de 25 años de edad) estaba recibiendo tratamiento antirretroviral con TDF/EFV/3TC y con baja carga viral. Sin embargo, sospechamos que los otros 2 pacientes también se encontraban bajo TAR debido a los niveles bajos de la carga viral. En la **Tabla 4.4** se pueden observar más detalladamente los resultados obtenidos en Kinshasa y en España para estas 23 muestras con resultado indeterminado en el origen. Asimismo, entre las muestras indeterminadas, existe una concordancia del 100% de las muestras positivas y negativas de VIH-1 entre el análisis de *Elecsys® HIV combi PT (Roche)* y *VIDAS® HIV Duo Quick (bioMérieux)*.

Tabla 4.4 Características y resultados detallados de las pruebas de los participantes con un resultado indeterminado del VIH por PDR locales (n = 23).

DATOS DEL PACIENTE							SEROLOGÍA DBS			DBS TEST MOLECULAR	
N	Diagnóstico VIH basado en PDRs	Fecha de diagnóstico	Edad (años)	CD4 (cél/mm ³)	TAR	Duración TAR (Meses)	<i>Elecsys Roche (COI)</i>	<i>VIDAS Biomerieux (VT)</i>	<i>Geenius HIV 1/2 prueba confirmatoria Bio-Rad*</i>	Carga viral Roche (log)	Diagnóstico o final
20	Indeterminado	2016-2018	39.1 (SD: 13.01)	-	-	-	Negativo Mediana COI: 0.291 (0.24-0.31)	Negativo Mediana VT: 0.16 (0.15-0.172)	gp36: - gp140: - p31: - gp160: - p24: - gp41: -	Indetectable	VIH-1 Negativo
1	Indeterminado	-	24.9	50	TDF+3TC +EFV	-	Positivo (COI:131)	Positivo VT: 19.85	gp36: - gp140: - p31: - gp160: ++ p24: - gp41: ++	2.93 log	VIH-1 Positivo
1	Indeterminado	-	38.1	-	-	-	Positivo (COI:118.7)	Positivo VT: 17.28	gp36: - gp140: - p31: - gp160: + p24: + gp41: ++	2.75 log	VIH-1 Positivo
1	Indeterminado	-	44.1	-	-	-	Positivo (COI:53.47)	Positivo VT: 16.85	gp36: - gp140: - p31: - gp160: + p24: - gp41: +	2.75 log	VIH-1 Positivo

-: no consta;

4.2.4 Diagnóstico serológico a partir de DBS de otras infecciones en RDC

Este estudio se realizó para analizar las posibles coinfecciones de hepatitis A (VHA), hepatitis B (VHB), hepatitis C (VHC), HTLV y sífilis de los pacientes adultos procedentes de Kinshasa. Se analizaron las muestras DBS de los pacientes infectados y no infectados con VIH-1 mediante *Elecsys® VIH combi PT (Roche)* y/o *VIDAS® VIH Duo Quick (BioMérieux)*.

Del análisis realizado para la detección de **VHA** se analizaron un total de 176 pacientes mediante el sistema *Elecsys® VHA combi PT (Roche)*, de los cuáles el 84.1% de los pacientes habían estado expuestos a este virus, estando el 46% coinfectados por VIH-1 y VHA (**Tabla 4.5**). Siendo la prevalencia del VHA del 85,1% en VIH+ y 82,9% en VIH- (p de Fisher: 0.424). No se pudo distinguir entre infección activa e infección pasada por VHA ya que no se realizó detección de IgM, únicamente de anticuerpos totales.

Tabla 4.5 Resultados de la infección por VHA y VIH.

	VHA+ (%)	VHA- (%)	Total
VIH+	80 (85,1)	14 (14,9)	94 (53,4)
VIH-	68 (82,9)	14 (17,1)	82 (46,6)
Total	148 (84,1)	28 (15,9)	176

Se realizó el estudio serológico de **VHB** analizando Ag de superficie de VHB (HBsAg) y anticuerpos totales frente a VHB-core (Anti-HBc), ambos mediante dos sistemas de detección. Se analizaron un total de 204 muestras mediante *Elecsys® COBAS* y 192 mediante *VIDAS (BioMérieux)*. De ellas se estudiaron por ambas técnicas un total de 88 muestras, de las cuales 69 (78.4%) eran positivas para VIH.

Tabla 4.6 Resultados de las determinaciones realizadas por ambas técnicas para VHB según detección de HBsAg.

<i>Elecsys® VHB combi PT (Roche)</i>				<i>VIDAS® VHB Duo Quick (BioMérieux)</i>				
	HBsAg+ (%)	HBsAg- (%)	Dudoso	Total		HBsAg+ (%)	HBsAg- (%)	Total
VIH+	7 (5,8)	112 (93,4)	1 (0,84)	120 (58,8)	VIH+	8 (4,8)	159 (95,2)	167 (87)
VIH-	5 (5,9)	79 (94)	0	84 (41,2)	VIH-	1 (4)	24 (96)	25 (13)
Total	12 (5,9)	191 (93,6)	1 (0,5)	204	Total	9 (4,7)	183 (95,3)	192

Tabla 4.7 Resultados de la detección de HBsAg con detección simultánea por COBAS y VIDAS según infección por VIH.

	<i>Elecsys® COBAS</i>			<i>VIDAS® (BioMérieux)</i>		
	HBsAg+ (%)	HBsAg- (%)	Total	HBsAg+ (%)	HBsAg- (%)	Total
VIH+	4 (5,8)	65 (94,2)	69 (78,4)	3 (4,3)	66 (95,6)	69 (78,4)
VIH-	1 (5,2)	18 (94,7)	19 (21,6)	1 (5,3)	18 (94,7)	19 (21,6)
Total	5 (5,7)	83 (94,3)	88	4 (4,5)	84 (95,5)	88
S (%) (IC95%)	100 (39,76-100)			100 (39,76-100)		
E (%) (IC95%)	98,81 (93,54- 99,97)			100 (95,7-100)		
VPP (%) (IC95%)	80 (36,31-96,56)			100		
VPN (%) (IC95%)	100			100		

Se obtuvieron 5 muestras positivas por *Elecsys HBsAg II (COBAS®)* (5,7%) y 4 por *VIDAS® HBsAg Ultra (HBS)* (4,5%) (**Tabla 4.7**). Una de las muestras analizadas dio un resultado discordante, negativo para HBsAg mediante *VIDAS® (BioMérieux)*, por tanto, se clasificó como falso positivo por *Elecsys HBsAg II (COBAS®)*. Por lo que se obtuvo una prevalencia del 4,5% de infección activa por VHB (4,4% en VIH+ vs 5,3 en VIH-, p Fisher= 0,629).

Respecto al HBc, en total se analizaron 202 muestras mediante *Elecsys Anti-HBc II (COBAS®)* y 168 mediante *VIDAS® Anti-HBcTotal II (Tabla 4.8)*. Del total de muestras analizamos un total de 92 muestras en paralelo mediante *VIDAS® Anti-HBcTotal II* y *Elecsys Anti-HBc II (COBAS®)*.

Tabla 4.8 Resultados de las determinaciones realizadas por ambas técnicas para VHB según detección de *Anti-HBc II*.

	<i>Elecsys® COBAS</i>			<i>VIDAS® (BioMérieux)</i>				
	Anti-HBc + (%)	Anti-HBc - (%)	Total		Anti-HBc + (%)	Anti-HBc - (%)	Dudoso	Total
VIH+	20 (16,7)	100 (83,3)	120 (59,4)	VIH+	16 (11,8)	120 (88,2)	4 (2,4)	136 (81)
VIH-	19 (23,2)	63 (76,8)	82 (40,6)	VIH-	1 (3,7)	26 (96,3)	1 (0,6)	27 (16,1)
Total	39 (19,3)	163 (80,7)	202	Total	17 (10,1)	146 (86,9)	5 (3)	168

Tabla 4.9 Resultados de la exposición a VHB y VIH, según la detección de Anti-HBc II por ambas técnicas.

	<i>Elecsys® COBAS</i>			<i>VIDAS® (BioMérieux)</i>			
	Anti-HBc + (%)	Anti-HBc - (%)	Total	Anti-HBc + (%)	Anti-HBc - (%)	Dudosos	Total
VIH+	17 (24,6)	52 (75,4)	69 (75)	6 (8,7)	61 (88,4)	2 (2,9)	69 (75)
VIH-	6 (26)	17 (73,9)	23 (25)	1 (4,3)	21 (91,3)	1 (4,3)	23 (25)
Total	23 (25)	69 (75)	92	7 (7,6)	82 (89,1)	3 (3,3)	92
S (%) (IC95%)	100 (69,15-100,00)			100 (69,15-100)			
E (%) (IC95%)	84,2 (74,42-91,28)			100 (95,6-100)			
VPP (%) (IC95%)	43,48 (31,84-55,88)			100			
VPN (%) (IC95%)	100			100			

En la prueba *Elecsys Anti-HBc II* (COBAS®) 23 muestras fueron positivas (25%), de las cuales 16 no concordaban con los resultados obtenidos por *VIDAS® Anti-HBc Total II*. En la prueba *VIDAS® Anti-HBc Total II*, 7 muestras fueron positivas (7,6%) y 3 de ellas de resultado dudoso (3,3%). En total, 10 muestras fueron clasificadas como verdaderas positivas por presencia del marcador *Anti-HBc Total II*, (10,9%) siendo indicativo de que habían tenido contacto con el virus a lo largo de su vida (10,6% en VIH+ y 10,5% en VIH-, p Fisher: 0,678). Obtuvimos una sensibilidad y especificidad alta por parte de *VIDAS® Anti-HBc Total II*, pero la especificidad de *Elecsys Anti-HBc II* (COBAS®) fue inferior (84,2) (**Tabla 4.9**)

En relación al **VHC**, se analizó un total de 206 (*Elecsys® VHC combi PT* (Roche)) y 171 pacientes por *VIDAS® VHC Duo Quick* (BioMérieux), respectivamente (**Tabla 4.10**).

Tabla 4.10 Resultados de las determinaciones realizadas para la detección de Anti-VHC.

	<i>Elecsys® combi PT (Roche)</i>				<i>VIDAS® Duo Quick (BioMérieux)</i>			
	VHC +	VHC -	Dudoso	Total	VHC +	VHC -	Total	
VIH+	10 (8,2)	111 (91)	1 (0,82)	122 (59,2)	VIH+	17 (12,6)	118 (87,4)	135 (78,9)
VIH-	2 (2,4)	82 (97,6)	0	84 (40,8)	VIH-	3 (8,3)	33 (91,7)	36 (21,1)
Total	12 (5,9)	193 (93,7)	1 (0,5)	206	Total	20 (11,7)	151 (88,3)	171

Sin embargo, pudimos analizar paralelamente 107 muestras. El ensayo de *Vidas*® *Anti-VHC* dio como resultado 18 muestras positivas frente a VHC (16,8%) y *Elecsys Anti-VHC II* para 12 pacientes (11,2%). Sin embargo, como se puede observar en la **Tabla 4.11**, la especificidad y sensibilidad de la técnica es inferior a *Elecsys Anti-HCV II (Roche)* debido a que 10 de las muestras analizadas por *Vidas*® *Anti-VHC* con resultado positivo eran falsos positivos y 5 muestras con resultado negativo eran falsos negativos (**Tabla 4.11**), por lo que al final obtuvimos un total de 13 muestras positivas (12 positivos + 1 dudoso finalmente positivo) de las cuales 11 estaban infectados también por VIH-1. Ocho muestras fueron positivas por ambos métodos (12,2% en VIH+ vs 9% en VIH-, p Fisher=0,124). Gracias a la información adicional de otras técnicas pudimos realizar la interpretación de los resultados discordantes.

Tabla 4.11 Resultados de la coinfección por VHC y VIH según la detección de Anti-VHC.

	<i>Elecsys (Roche)</i>				<i>Vidas</i> ® (<i>BioMerieux</i>)		
	VHC +	VHC -	Dudoso	Total	VHC +	VHC -	Total
VIH+	9 (12,2)	64 (86,5)	1 (1,3)	74 (69,2)	15 (14)	59 (55,1)	74 (69,2)
VIH-	3 (9)	30 (90,9)	0	33 (30,8)	3 (2,8)	30 (28)	33 (30,8)
Total	12 (11,2)	94 (87,8)	1 (0,9)	107	18 (16,8)	89 (83,1)	107
S (%) (IC95%)	100 (73,54 - 100,00)				61,5 (31,6-86,1)		
E (%) (IC95%)	100 (96,19 - 100,00)				89,4 (81,3-94,8)		
VPP (%) (IC95%)	100				44,4 (21,5-69,2)		
VPN (%) (IC95%%)	100				94,4 (87,4-98,1)		

Para el estudio de infección por **HTLV** se analizaron 307 muestras mediante *Elecsys*® *HTLV combi PT (Roche)*. La prevalencia de infección por HTLV fue del 1,4% en VIH+ vs 2,3% en VIH- (p Fisher= 0,451), y un 0,9% de las muestras presentaban coinfección por HTLV y VIH-1 (**Tabla 4.12**). En los seropositivos para HTLV la mediana del COI fue 2,37 (1,52-6,47), mientras que en los seronegativos fue 0,1495 (0,131-0,165).

Tabla 4.12 Resultados de la infección por HTLV y VIH.

	HTLV + (%)	HTLV - (%)	Total
VIH+	3 (1,4)	216 (70,4)	219 (71,3)
VIH-	2 (2,3)	86 (97,7)	88 (28,7)
Total	5 (1,6)	302 (98,4)	307

En relación con la **sífilis** se evaluaron anticuerpos treponémicos totales (IgG+IgM) en un total de 202 muestras mediante *Elecsys® COBAS Syphilis*. Solo un paciente (0.5%) clasificado como VIH indeterminado en Kinshasa presentaba anticuerpos frente a *Treponema pallidum* (**Tabla 4.13**) pero no estaba infectado por VIH.

Tabla 4.13 Resultados de la infección por sífilis y VIH.

	Sífilis + (%)	Sífilis- (%)	Total
VIH+	0 (0)	119 (100)	119 (58,9)
VIH-	1 (1,2)	82 (98,8)	83 (41,1)
Total	1 (0,5)	201 (99,5)	202

4.3 Diagnóstico molecular a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa

4.3.1 Comparación métodos de elución DBS para cuantificación viral

Se analizó la carga viral de nuestra población mediante el ensayo *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)* utilizando dos posibles productos de elución de la sangre seca: *buffer SPEX vs buffer de lysis de NucliSENS® easyMAG®*. Se analizó un total de 365 muestras DBS mediante *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche) SPEX* y 49 muestras DBS mediante el protocolo de *NucliSENS® easyMAG®*. El método *Roche-CV-SPEX* permitió detectar ARN de VIH-1 en el 63,8% de muestras eluidas con este producto, mientras que se detectaron un 65,3% de muestras positivas con el *buffer de lysis de NucliSENS® easyMAG®*.

Comparando la viremia detectada de las muestras analizadas paralelamente (n=49) por la técnica cuantitativa empleada según las condiciones utilizadas, *Roche-CV-Spex* y *Roche-CV-Buffer Lysis* se detectó una carga viral ≥ 20 cp/dot (tras corregir por hematocrito) para 46 (93,9%) vs. 32 (65,3%) muestras de DBS, respectivamente. *Roche-CV-Spex* permitió detectar 14 de las muestras no detectadas por *Roche-CV-Buffer Lysis*, sin embargo, mediante las condiciones de *Roche-CV-Buffer Lysis* no se detectó ninguna muestra que no fuera detectada por *Roche-CV-Spex*. (**Tabla 4.14**).

Tabla 4.14 Cuantificación de ARN VIH-1 en 49 DBS de adultos con VIH-1 usando un mismo ensayo molecular (*Roche*) pero dos productos de elución *buffer SPEX Roche®* y *buffer de lysis NucliSENS® easyMAG®*)

		<i>Roche-CV-Buffer Lysis</i>					
		N	No detectado	Detectado, <20 cp/dot	≥20-1.000 cp/dot	>1.000 cp/dot	
<i>Roche-CV-SPEX</i>	No detectado	3	3	0	0	0	
	Detectado <20 cp/dot	9	8	1	0	0	
	Cuantificado ≥20 cp/dot	20-39 cp/dot	5	3	1	1	0
		40-1.000 cp/dot	12	3	0	9	0
		>1.000 cp/dot	20	0	0	2	18
N total		49	17	2	12	18	

*CV, carga viral del VIH; DBS, *dried blood spots* o muestra de sangre seca; cp/dot, copias de ARN del VIH-1 por círculo del DBS o gota de sangre seca.

Al analizar la correlación entre los dos métodos de elución utilizados, para las 32 muestras con CV detectable por ambas técnicas, se observó una correlación moderada en la detección de CV entre ambas técnicas ($R^2 = 0.452$), (**Figura 4.2**).

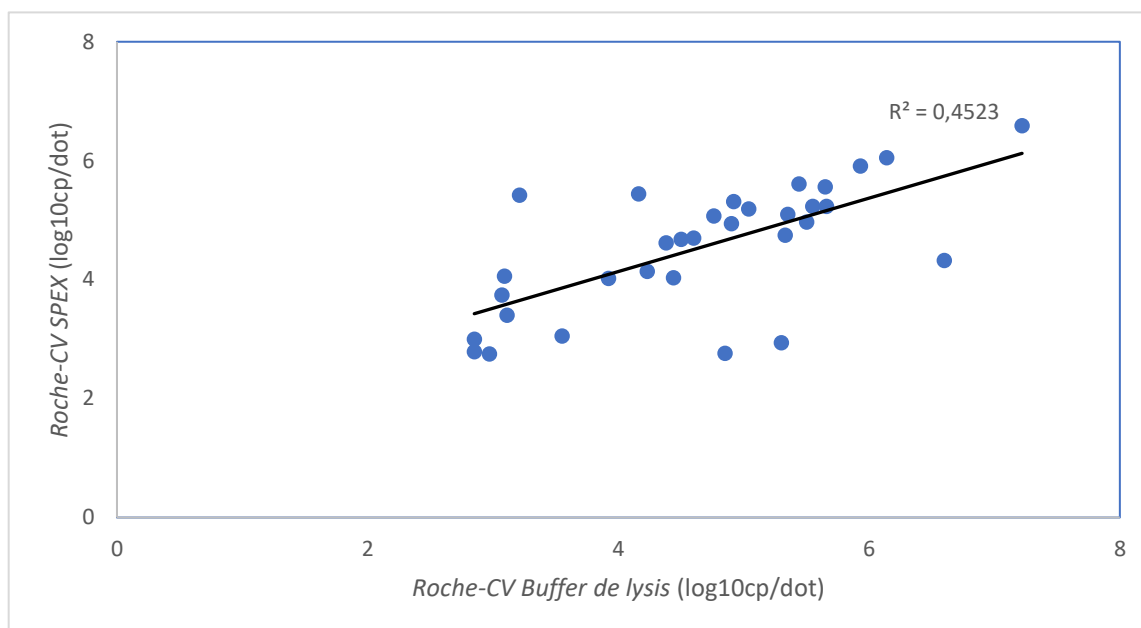


Figura 4.2 Correlación entre los *bufferes Lysis* de *EasyMag* y *SPEX* mediante *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)* en 32 muestras con VIH-1 positivo y carga viral cuantificada ($CV \geq 20cp/ml$). Gráfico usando la CV directa de los DBS (copias de ARN del VIH-1 por mL). CV, carga viral.

4.3.2 Comparación sistemas de cuantificación para cuantificación viral a partir de DBS

Analizamos un total de 365 muestras de DBS para el estudio de la carga viral de nuestra población mediante *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)* y 116 muestras DBS mediante *Xpert HIV-1 VL (Cepheid)*. Entre los DBS con VIH-1 confirmado, excluyendo las muestras clasificadas como falsos positivos ($n=11$) y analizando las muestras estudiadas *COBAS Roche-CV* pudo detectar el 63.8% y *Xpert-CV* pudo detectar el 88.8% y (**Tabla 4.15**).

Tabla 4.15 Cuantificación de la CV del VIH-1 en 116 DBS de adultos con VIH-1 usando dos ensayos moleculares.

		<i>Xpert HIV-1 VL (Cepheid)</i>							
						Cuantificado ≥40cp/círculo			
		No detectado	Inválido	Detectado <40 cp/dot	40-1.000 cp/dot	>1.000 cp/dot	Ct media COBAS [rango]	N	
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)	No detectado	8	0	2	1	0	0	11	
	Detectado <20 cp/dot	4	0	10	3	0	34.2 (30.1-36.6)	17	
	Cuantificado ≥20 cp/dot	20-39 cp/dot	0	0	3	18	0	32.9 (31.8-35.3)	21
		40-1.000 cp/dot	0	0	1	24	6	30.3 (28.2-32.8)	31
		>1.000 cp/dot	0	1	0	4	31	25.4 (20.3-28.1)	36
	Ct media <i>Xpert</i> [rango]		-	-	39.7 (33.2-42.6)	35.9 (23.6-42.2)	30.9 (27.7-33.9)	-	-
	N		12	1	16	50	37	-	116

Nº, número; CV, carga viral del VIH; DBS, *dried blood spots* o muestra de sangre seca; cp/círculo, copias de ARN del VIH-1 por círculo del DBS o sangre seca; Ct, ciclo específico o *cycle threshold*. Los valores de Ct se correlacionan inversamente con la concentración inicial de genoma viral en muestras infectadas.

Entre esas muestras con ARN de VIH-1 detectable, y comparando la viremia detectada de las muestras analizadas paralelamente por las dos técnicas cuantitativas empleadas (n=116), *Xpert-CV vs Roche-CV* fueron capaces de detectar y proporcionar valores de CV en los DBS (≥40 vs. ≥20 cp/dot del DBS o ≥936-1078 vs. ≥468-539 cp/ml plasma tras corregir por hematocrito) para 103 (88.8%) vs 105 (90.5%) muestras de DBS, respectivamente. *Xpert-CV* detectó 3 muestras no detectadas por *Roche-CV* (<20 cp/ml), mientras que *Roche-CV* pudo detectar 4 muestras por debajo del límite de detección de *Xpert-CV* (<40 cp/ml) y 1 muestra invalidada durante la realización del proceso (**Tabla 4.15**).

Los resultados de CV, dentro del rango de detección de ambas técnicas, estuvieron disponibles para 100 pacientes con VIH-1 para ambas técnicas. Se observó una correlación elevada en la detección de CV entre ambas técnicas ($R^2 = 0.760$) (**Figura 4.3**). Sin embargo, los valores de Ct observados fueron dependientes del ensayo de CV y diferentes en los 100 DBS y cuantificados por ambas técnicas de CV (**Tabla 4.15**). *Xpert-CV* proporcionó una Ct media más alta ($34.5 \text{ DE} \pm 4.13$, rango [23.6-42.6]) que *Roche-CV* ($29.6 \text{ DE} \pm 3.78$, [20.3-36.6]) en el panel. Ello dio lugar a una CV media por *Xpert-CV* de $4.31 \text{ log cp/ml DE} \pm 1.1$ y el promedio de CV por *Roche-CV* fue de $3.96 \text{ log cp/ml DE} \pm 1.1$.

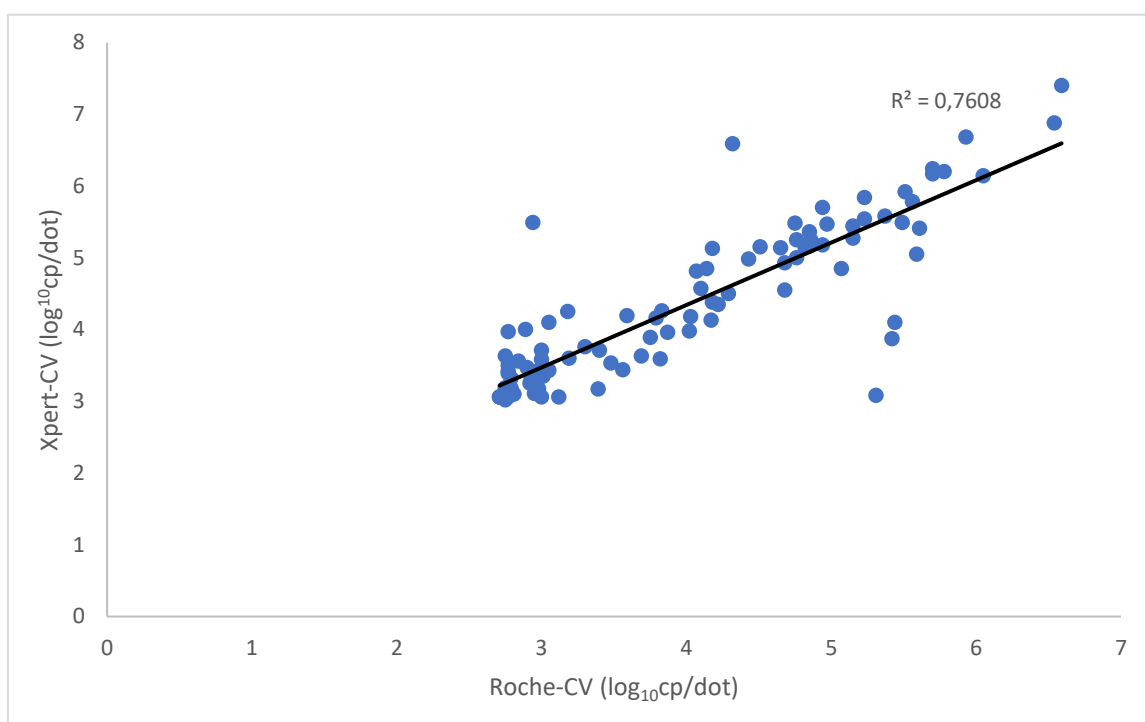


Figura 4.3 Correlación entre los ensayos *GeneXpert-CV* y *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)* en 100 muestras con VIH-1 positivo y carga viral cuantificada. Diagrama de dispersión de las 100 muestras que se detectaron y cuantificaron por ambos ensayos, ($CV \geq 40$ o $\geq 20 \text{ cp/ml}$, respectivamente). Gráfico usando la CV directa de los DBS (copias de ARN del VIH-1 por mL). CV, carga viral.

4.3.3 Análisis de los DBS mediante *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)*. Cuantificación de carga viral.

Todas las muestras ($n=365$) fueron analizadas por *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)* para la detección y cuantificación del ARN del VIH-1 sirviendo como ensayo confirmatorio adicional a las técnicas serológicas utilizadas. Los resultados de carga viral dentro del rango de cuantificación del ensayo estaban disponibles para 232 pacientes (63,5%) pero para

133 (36,4%) pacientes no se detectó ARN de VIH. La mediana de carga viral de nuestras muestras positivas fue de 1.225 cp/ml (RIC: 562-33.916).

La especificidad de este ensayo fue del 98,8%, pero la sensibilidad para el diagnóstico de VIH fue menor que las demás técnicas (88%). En la **Tabla 4.16**, se puede observar la sensibilidad y especificidad de la técnica; en la que se incluyen todos los pacientes excepto aquellos que estuvieran bajo TAR con carga viral indetectable (n=17).

Tabla 4.16 Resultados resumidos del diagnóstico serológico y molecular de VIH en España a partir de muestras de Kinshasa (RDC).

		<i>Elecsys® VIH combi PT (Roche)</i> (n=365)		<i>VIDAS® VIH Duo Quick (BioMérieux)</i> (n=365)		<i>Geenius VIH 1/2 ensayo confirmatorio (Geenius, Bio-Rad, USA)</i> (n=135)		<i>COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)</i> (n=365)	
		+	-	+	-	+	-	+	-
PDR (n=365)	+ (n=280)	270	10	269	11	97	15	232	31
	ID (n=23)	3	20	3	20	3	20	3	20
	- (n=62)	0	62	0	62	0	0	0	62
S		100% (98.6 - 100)		100% (98.6 - 100)		91,7% (84.9 - 96.1)		88.1% (85.4-90.8)	
E		98,9% (94.1- 99.9)		100% (96.1 - 100)		100% (86.8 - 100)		98,8% (94.1-100)	
VPP		99,6% (97.9 - 99.9)		100% (98.6 - 100)		100% (96.4 - 100)		99,5% (96.2-100)	
VPN		100% (96.1 - 100)		100% (96.1 - 100)		74,3% (56.7 – 87.5)		72.8% (68.7 - 76.9)	

S, sensibilidad; E, especificidad, VPP, valor predictivo positivo, VPN, valor predictivo negativo.

En la **Figura 4.4** se observa que los pacientes que estaban bajo tratamiento antirretroviral o habían tenido experiencia previa mostraban una carga viral baja en casi la mitad (47.5%) de su grupo, sin embargo, un 35.2% de los pacientes presentaban una carga viral muy alta, probablemente en fallo virológico.

Se observa un aumento proporcional a medida que nos acercamos a niveles de 3 log cp/mL, con una excepción en los pacientes entre 4 y 5 log cp/mL, hay un incremento del 3,1% en este rango respecto los niveles de 3 log cp/mL.

En los pacientes naïve, un 64.5% de pacientes presentaba baja carga viral y un 35.5% carga viral alta, muy similar a los pacientes en TAR. Respecto a los pacientes sin datos de TAR, el 60.6% de los pacientes presentaba niveles de ARN de VIH-1 elevados, solo 13 pacientes tenían niveles de 3 log cp/mL.

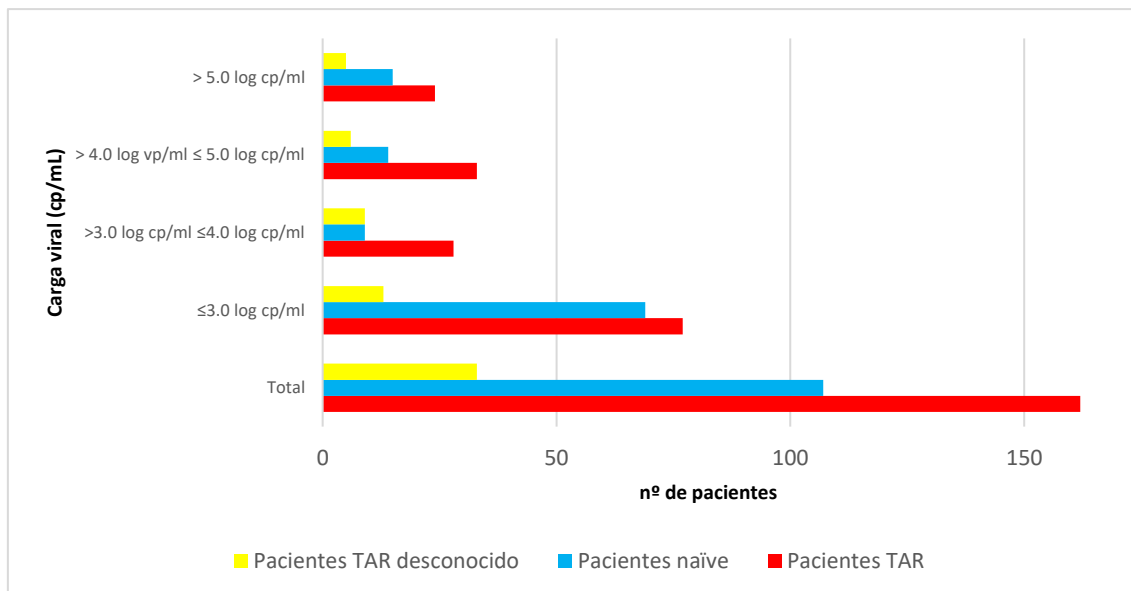


Figura 4.4 Carga viral de los pacientes VIH-1 (n=302) procedentes de Kinshasa según su experiencia con el tratamiento antirretroviral (TAR).

4.4 Caracterización molecular de VIH-1 a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa

4.4.1 Estudio genotípico de VIH-1 en Kinshasa

Se realizó el estudio genotípico en las muestras de pacientes VIH+ (n=272) con carga viral detectable (n=230) para evaluar la diversidad genética del VIH-1 y la presencia de mutaciones de resistencia.

4.4.1.1 Descripción de la población VIH estudiada

La **Tabla 4.17** describe las características principales de los pacientes VIH+ según si estaban o no bajo tratamiento antirretroviral o habían tenido experiencia previa. Como se muestra, de los 272 pacientes VIH+, el 84,6% tenían carga viral detectable y el 46,3% presentaba una carga viral por encima de las 1.000 cp/mL. La mayoría pertenecía al grupo de pacientes con experiencia en TAR. De las muestras con carga viral detectable, se obtuvieron 223 (61,6%) secuencias para la proteasa (PR), 224 (61,9%) para la retrotranscriptasa (RT) y 225 (62,2%) para la integrasa (IN). Las secuencias fueron obtenidas utilizando en varias ocasiones enzimas diferentes, la enzima *AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase* y la enzima *KAPA Taq HotStart DNA Polymerase*. En total, se obtuvieron **81 (36,3%)** secuencias amplificadas correctamente para la PR, de las cuáles 76 fueron obtenidas mediante la enzima KAPA y 5 mediante TaqGold; **90 (40,2%)** para la RT, 85 mediante la enzima KAPA y 5 mediante TaqGold; por último, **74 secuencias (32,9%)** de IN, de las cuáles 71 se obtuvieron mediante KAPA y 3 por la enzima TaqGold.

Sin embargo, de acuerdo al análisis realizado por la herramienta Stanford VIH Database de la secuencia obtenida, excluimos un total de 15 secuencias debido a la presencia de mutaciones APOBEC, 4 secuencias de PR, 5 secuencias de RT y 6 secuencias de IN obteniendo un total de 230 secuencias correctamente amplificadas (77PR/85RT/68IN) pertenecientes a 111 sujetos.

Tabla 4.17 Características de los pacientes y las muestras analizadas para secuenciación de VIH en Kinshasa (RDC) (n= 272).

	Adultos VIH + (n=272) (%)	TAR-Naïve (n=86) (%)	TAR-expuestos (n=156) (%)	Estado TAR Desconocido (n=30) (%)
Edad (años), media (DT)	43,1 (DE:18,67)	42,6 (DE:17,16)	43,1(DE:17,13)	42,9 (DE:18,73)
Mujeres	158 (58)	47 (54,7)	105 (67,3)	6 (20)
CD4 T (cél/μL), mediana (RIC)	259,5 (RIC: 131-398)	262 (RIC:138-399)	259,5 (RIC: 131-398)	312(RIC: 250,5-479,5)
VIH-1 carga viral (log ₁₀ RNA copias/mL), mediana (RIC)	604,5 cp/ml (RIC: 326-14558,5)	585 cp/ml (RIC: 326-10838,5)	632,5 cp/ml (RIC: 326-14948,5)	458 cp/ml (RIC: 326-5177)
VIH-1 carga viral >1.000 copias/mL	126 (46,3)	33 (38,4)	85 (54,5)	8 (26,7)
PR Secuenciadas	81 (22,4)	19 (17,8)	51 (31,5)	11 (33,3)
RT Secuenciadas	90 (24,9)	21 (19,6)	57 (35,2)	12 (36,4)
IN Secuenciadas	74 (20,4)	16 (21,6)	48 (64,9)	10 (13,5)
ARVs: 1 ^{er} TAR				
AZT	88(32,3)	-	88(32,3)	-
ABC	1(0,4)	-	1(0,4)	-
TDF	64(23,5)	-	64(23,5)	-
3TC	151(55,5)	-	151(55,5)	-
EFV	69(25,4)	-	69(25,4)	-
NVP	79(29)	-	79(29)	-
LPV/r	3(1,1)	-	3(1,1)	-
Mediana de meses en tratamiento (RIC)	66 (RIC: 48-106)	-	66 (RIC: 48-106)	-

4.4.1.2 Prevalencia de subtipos y formas recombinantes en Kinshasa

Los distintos subtipos y cepas recombinantes de VIH-1 fueron observados en las secuencias de **111 sujetos**. Globalmente, el subtipo más prevalente fue el subtipo puro A que estaba presente en el 25,2% (28/111) de los pacientes, seguido de los recombinantes, las formas recombinantes circulantes (CRFs) y las formas recombinantes únicas (URFs) con un 18% (20/111) y 15,3% (17/111) de las muestras, respectivamente; y el subtipo G (9%, 10/111) y C (9%, 10/111). Además, también encontramos 6 (5,4%) secuencias sin referencia de clasificación de subtipos, se clasificaron como U, de única o variante desconocida, no relacionada con los subtipos puros, CRF o URF. **(Figura 4.5)**. Entre las formas recombinantes, el CRF45_cpx fue el más prevalente, detectado en un 20% de los sujetos infectados por formas recombinantes; y entre los pacientes infectados con URFs, el 41.2% presentaba el URF_AU como variante infectante.

Cuando se analizaron las secuencias de los 111 sujetos por su experiencia en TAR, obtuvimos que en los pacientes que se encontraban bajo tratamiento antirretroviral (n=72) tenían como subtipo predominante el subtipo puro A (25%) seguido de los CRFs y los URFs en un 15.3% respectivamente. Entre estos sujetos, la cepa más prevalente fueron 3 en el caso de los CRFs, CRF03_cpx, CRF27_cpx y CRF45_cpx en un 18.2% de los sujetos, cada uno; en el caso de las formas recombinantes únicas, el 45% de los pacientes presentaba el URF_AU. **(Figura 4.6)**

En los pacientes naïve (n=25) el subtipo A fue el predominante con un 32% de los sujetos. Además, los CRFs fueron las siguientes cepas más prevalentes con 28% de los pacientes, el CRF45_cpx siguió siendo el más prevalente de las variantes. En cambio, en los pacientes de los cuáles desconocíamos los datos de su TAR (n=14), obtuvimos que un 28.6% de los pacientes estaban infectados por URFs, entre los que el 50% presentaban la variante infectante URF_AU. Entre los demás pacientes observamos diversas variantes entre las que encontramos el subtipo puro A, G o un CRF en un 14,3%, cada uno. **(Figura 4.6)**

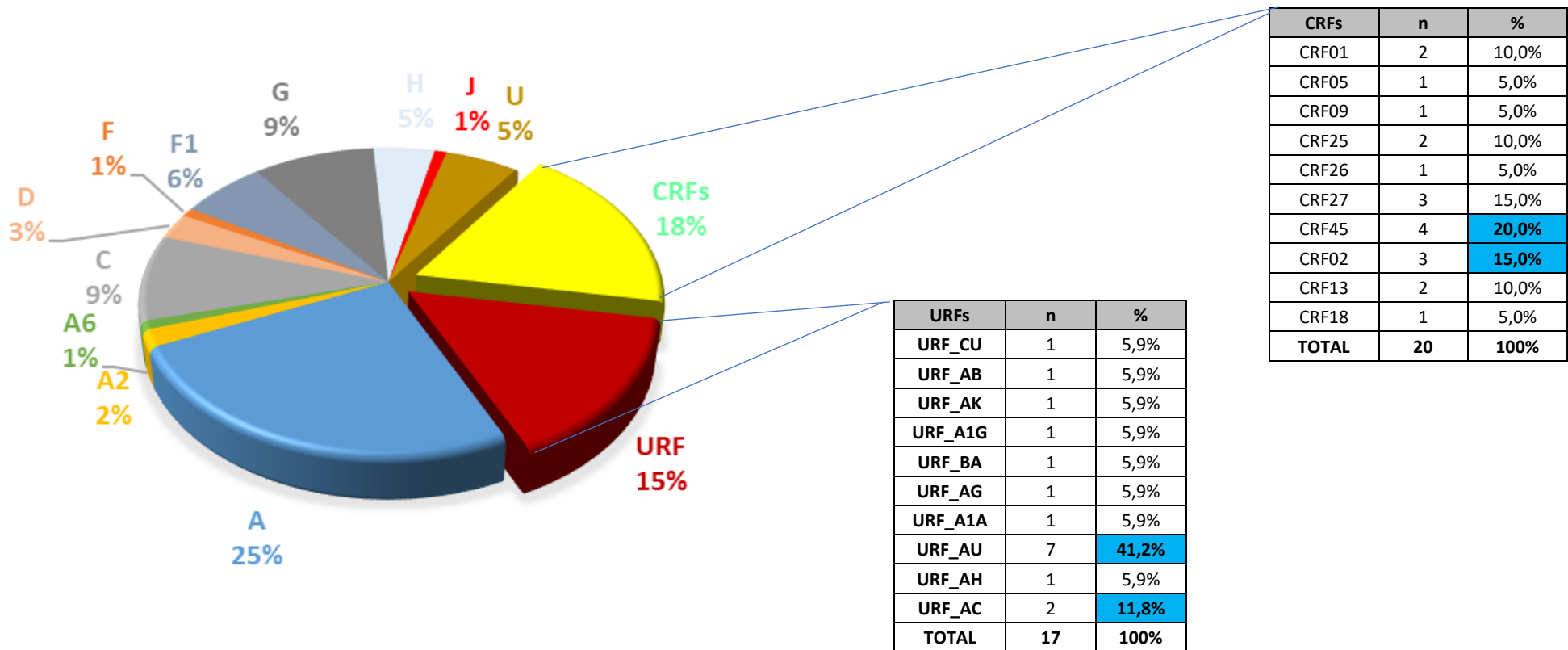


Figura 4.5 Caracterización actual por epidemiología molecular en la cohorte de estudio de las secuencias de pacientes de VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2019. Porcentajes calculados considerando las nuevas secuencias pol del VIH-1 generadas a partir de los DBS de los 111 pacientes infectados por VIH-1 en Kinshasa durante 2016-2019 con secuencia disponible.

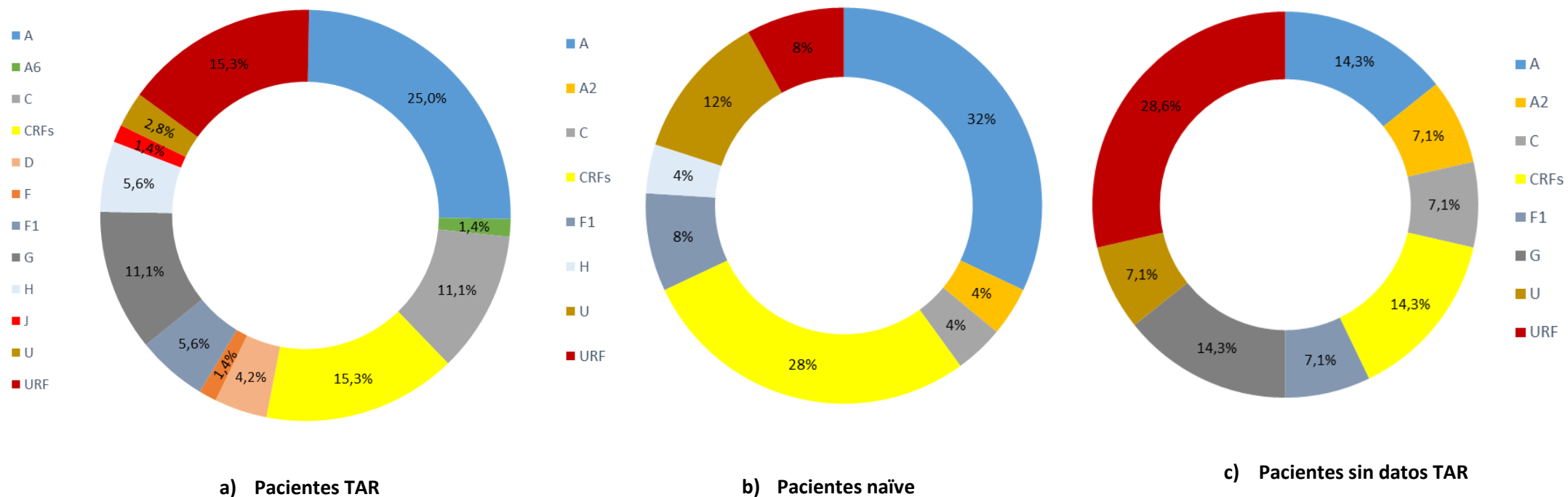


Figura 4.6 Caracterización actual por epidemiología molecular en la cohorte de estudio de las secuencias de pacientes de VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2019 según su experiencia en TAR. Porcentajes calculados considerando las nuevas secuencias pol del VIH-1 generadas a partir de los DBS de los 111 pacientes infectados por VIH-1 en Kinshasa durante 2016-2019 con secuencia disponible según su experiencia con el tratamiento antirretroviral. Representación de los pacientes bajo TAR (A), pacientes naïve (B) y pacientes sin datos de su TAR (C).

4.4.1.3 Comparación de herramientas para determinación de subtipo/CRF de VIH-1

El análisis filogenético realizado mediante la herramienta MEGA 6, nos proporcionó el resultado final del estudio del genotipo de las secuencias de 111 pacientes VIH-1 procedentes de Kinshasa, RDC. Previamente a la realización del análisis filogenético se realizó el estudio del genotipo mediante otras herramientas como *Stanford HIV database* y *Geno2pheno (Genafor)*. Se utilizaron en varias ocasiones varios fragmentos genómicos de manera simultánea para obtener el genotipo de la cepa.

Comparamos los resultados obtenidos de genotipado entre las herramientas de *Stanford* y *Geno2pheno* y frente al análisis filogenético de las dianas PR, RT e INT.

Mediante la herramienta *Stanford HIV Database* se obtuvo el genotipo del 34,2% de secuencias de PR, 24,3% de secuencias de RT y un 31,5% de secuencias de IN correctamente identificado en base al análisis realizado mediante análisis filogenético. En la **Tabla 4.18** se muestran en más detalle los resultados obtenidos de las diferentes herramientas genotípicas vs el análisis filogenético. Mediante la herramienta *Geno2pheno resistance* proporcionada por GENAFOR analizamos también estos 111 pacientes, pero obtuvimos una tasa inferior respecto a *Stanford HIV Database* ya que únicamente el genotipo del 21,6% de las secuencias de PR y 14,4% de RT e IN, respectivamente fue identificado correctamente en base a la técnica de referencia.

Tabla 4.18 Concordancia del genotipado realizado con dos herramientas online (*Stanford HIV Database* y *Geno2pheno*) con respecto al análisis filogenético.

	PR (n)	%	RT (n)	%	IN (n)	%
Geno2pheno	24	21,6%	16	14,4%	16	14,4%
Stanford HIV Database	38	34,2%	27	24,3%	35	31,5%

* Porcentaje de similitud con los resultados obtenidos mediante el análisis filogenético.

Por otro lado, en las **Figuras 4.7, 4.8 y 4.9** podemos observar la distribución obtenida de *Stanford HIV Database vs Geno2pheno resistance* de los 111 pacientes con subtipado según la diana. Obtuvimos diferentes prevalencias de subtipos en función de la PR, RT e IN de los pacientes y según la herramienta utilizada. Obtuvimos 77 pacientes con secuencias de PR analizadas mediante ambas herramientas, dando lugar al 31%

de secuencias con subtipo A mediante *Stanford* y un 23% para el subtipo A1 mediante *Geno2pheno* como subtipo más prevalente. En RT, 85 pacientes tenían secuencia correcta y pudieron ser subtipados por ambas herramientas, se mantuvo el subtipo A1 (24%) y A (34%) como subtipos prevalentes mediante *Geno2pheno* y *Stanford*, respectivamente seguidos del subtipo C (12%) y G (12%).

En cambio, en las secuencias de IN de los 68 pacientes, obtuvimos que el subtipo A aumentó a un 35% como subtipo más prevalente mediante la herramienta *Stanford* seguido del subtipo C (9%). En cambio, mediante la herramienta *Geno2pheno*, obtuvimos que el subtipo más prevalente fue el subtipo A1 seguido de un recombinante, el CRF02_AG (7%).

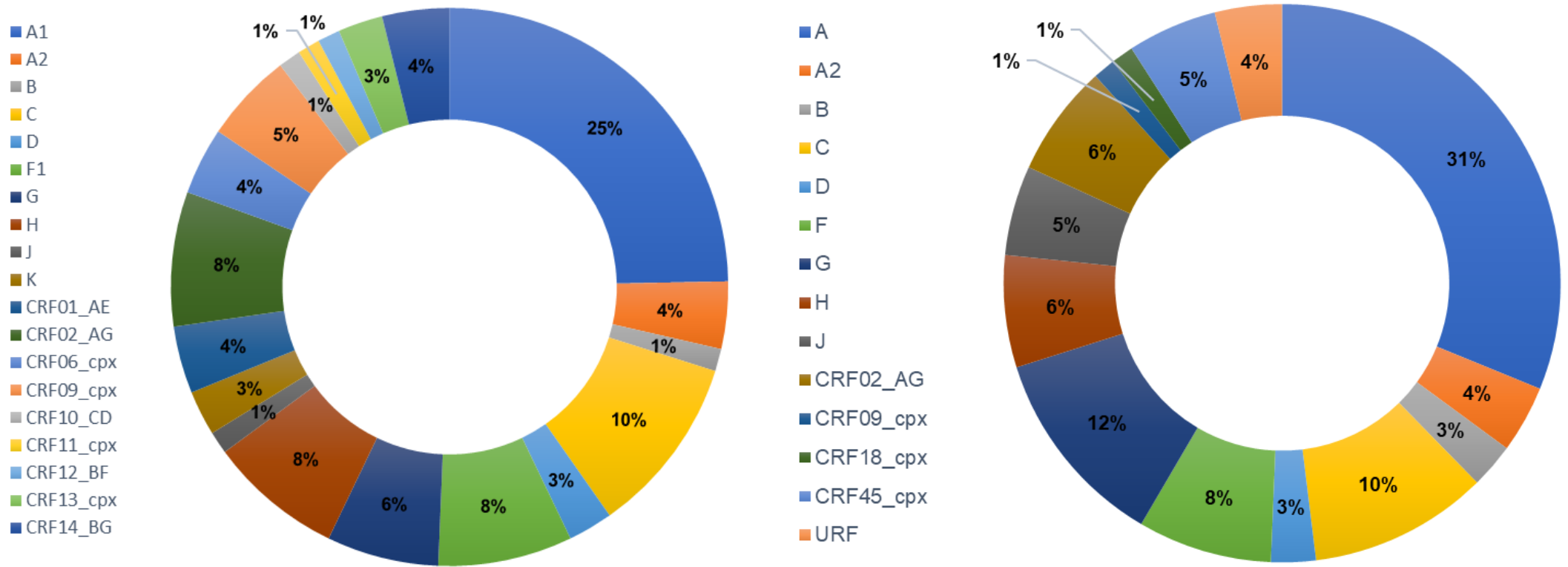


Figura 4.7 Comparación de la caracterización por epidemiología molecular en la cohorte de estudio de las secuencias de proteasa (PR) de pacientes de VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2019 mediante las herramientas de genotipado Stanford HIV Database (derecha) y geno2pheno resistance (izquierda). Porcentajes calculados considerando las nuevas secuencias pol del VIH-1 generadas a partir de los DBS de los 77 pacientes infectados por VIH-1 en Kinshasa durante 2016-2019 con secuencia disponible.

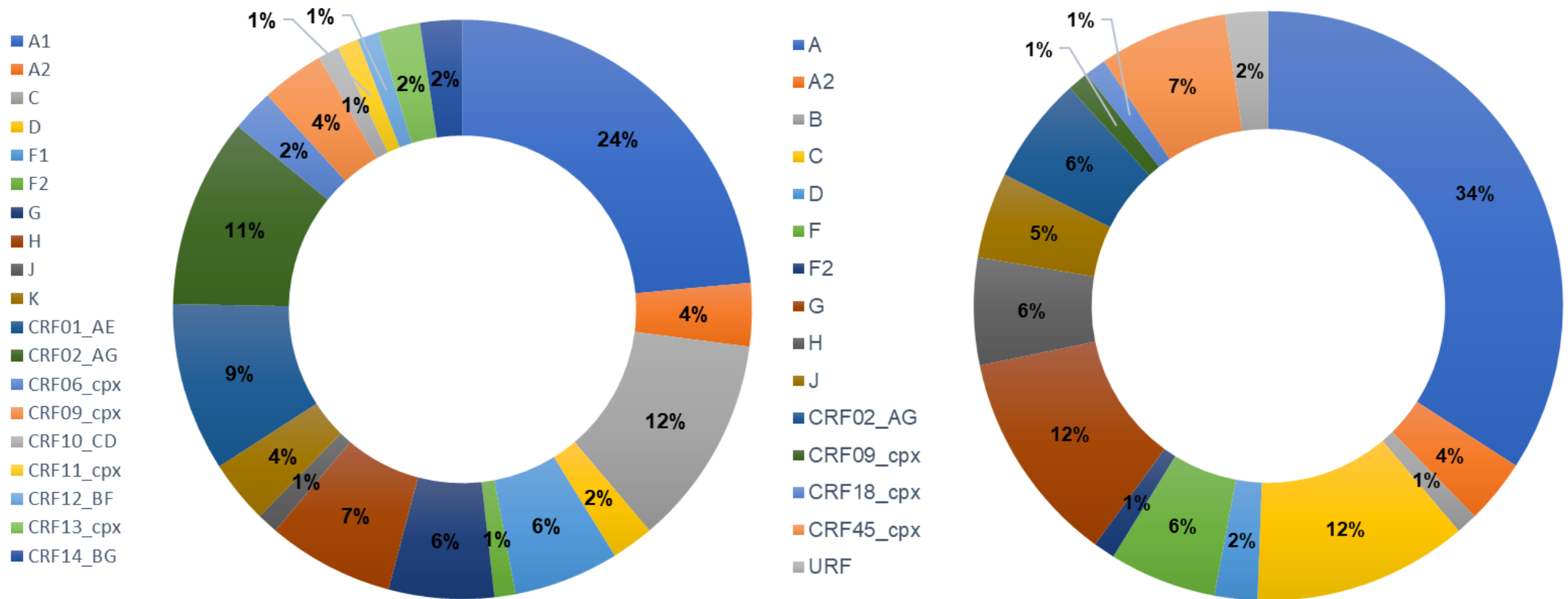
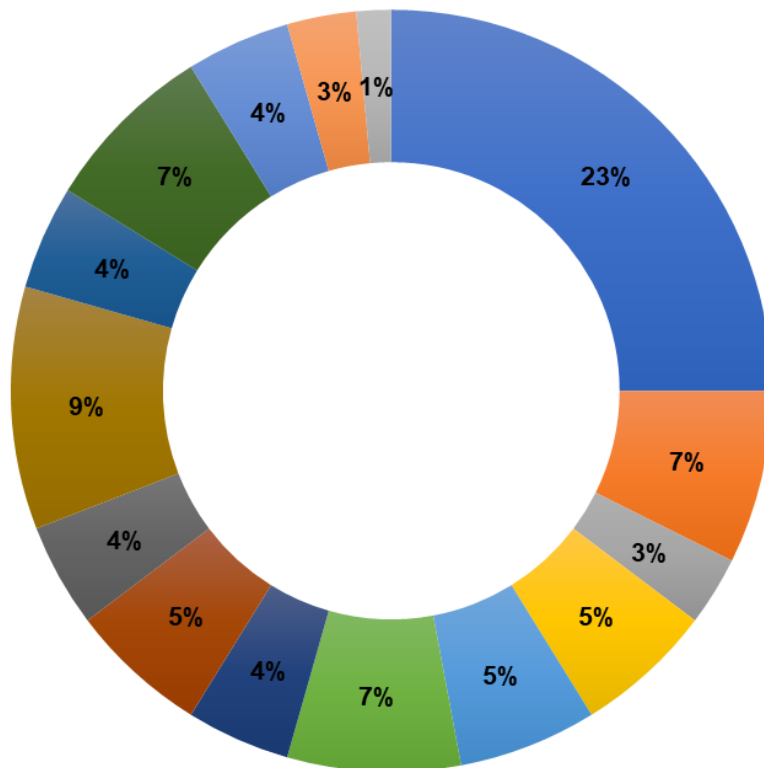


Figura 4.8 Comparación de la caracterización por epidemiología molecular en la cohorte de estudio de las secuencias de transcriptasa inversa (RT) de pacientes de VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2019 mediante las herramientas de genotipado Stanford HIV Database (derecha) y geno2pheno resistance (izquierda). Porcentajes calculados considerando las nuevas secuencias pol del VIH-1 generadas a partir de los DBS de los 85 pacientes infectados por VIH-1 en Kinshasa durante 2016-2019 con secuencia disponible.

- A1
- A2
- B
- C
- D
- F1
- G
- H
- CRF01_AE
- CRF02_AG
- CRF04_cpx
- CRF06_cpx
- CRF07_BC
- CRF11_cpx
- CRF14_BG



- A
- A2
- C
- D
- F
- F2
- G
- H
- J
- CRF01_AE
- CRF02_AG
- CRF05_DF
- CRF09_cpx
- CRF18_cpx

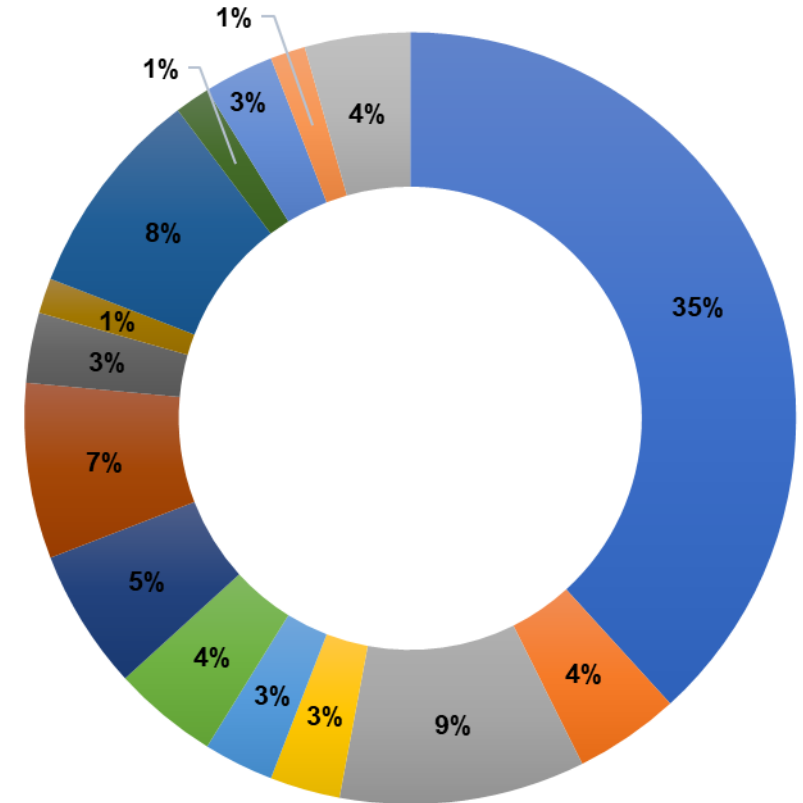


Figura 4.9 Comparación de la Caracterización por epidemiología molecular en la cohorte de estudio de las secuencias de integrasa (INT) de pacientes de VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2019 mediante las herramientas de genotipado Stanford HIV Database (derecha) y geno2pheno resistance (izquierda). Porcentajes calculados considerando las nuevas secuencias pol del VIH-1 generadas a partir de los DBS de los 68 pacientes infectados por VIH-1 en Kinshasa durante 2016-2019 con secuencia disponible.

4.4.2 Prevalencia de mutaciones de resistencia de VIH-1 en Kinshasa, RDC.

Globalmente, se observa una prevalencia de resistencia del **18.3% (42/230)** entre todas las secuencias obtenidas de PR, RT e IN de los pacientes VIH-1 procedentes de Kinshasa. Entre estas secuencias, el 59.5% pertenecían a sujetos que se encontraban o habían tenido experiencia previa con el tratamiento antirretroviral; el 23.8% a sujetos de los cuáles desconocíamos si estaban bajo TAR y un 16.7% a pacientes naïve.

Tabla 4.19 Mutaciones de resistencia presentes en las muestras de pacientes VIH+ según la combinación de mutaciones frente a los ARVs.

Presencia mutaciones de resistencia a ARVs	n Total (%)	n Naïve (%)	n TAR (%)	N TAR Desconocido (%)
Solo ITIANS (n=1)	1/32 (3.1)	-	1/1 (100)	-
Solo ITINANS (n=19)	19/32 (59.4)	3/17 (17.6)	12/17 (70.6)	4/17 (23.5)
ITIANS+ITINANS (n=12)	12/32 (37.5)	-	9/12 (75)	3/12 (25)
Solo IP (n=1)	1/5 (20)	-	-	1/1 (100)
IP + INI (n=1)	1/5 (20)	-	-	1/1 (100)
IP + ITINANS (n=2)	2/5 (4.8)	1/2(50)	1/2 (50)	-
IP + ITIANS + ITINANS (n=1)	1/5 (20)	-	1/1 (100)	-
Solo INI (n=2)	2/5 (40)	2/2 (100)	-	-
INI + IP (n=1)	1/5 (20)	-	-	1/1 (100)
INI + ITINANS (n=1)	1/5 (20)	1/1 (100)	-	-
INI + ITIANS + ITINANS (n=1)	1/5 (20)	-	1/1 (100)	-

Por otro lado, se llevó a cabo el análisis del perfil de resistencia analizando la carga viral de las muestras con al menos resistencia a una clase de antirretroviral, se observó alta variabilidad en la tasa de resistencia de los pacientes según la carga viral detectada. Un total de 91 sujetos fueron analizados, el 19,8% tenían un nivel de viremia $>3,0- \leq 4,0 \log_{10}$ de cp/mL con un 67% de pacientes con resistencia a ITIANS, ITINANS, IP o INIs; especialmente aquellos con mutaciones a ambas clases de inhibidores de la retrotranscriptasa, ITINANS + ITIANS con un 28% y los que tenían solamente mutaciones de resistencia a ITINANS (22%). La resistencia a los inhibidores de proteasa e integrasa fue un 6% de resistencia, en pacientes solo con mutaciones a INIs o IPs, respectivamente. Un 40.7% de los sujetos tenía niveles de carga viral mayores de 5,0

\log_{10} cp/ml y obtuvimos una tasa de resistencia frente a ARVs del 43%; la resistencia a los ITINANs era mayor (19%) que la pauta de tratamiento combinada de ITINANs + ITIANs (16%). La tasa de resistencia a IPs e INIs fue inferior, un 3%, respectivamente. Sin embargo, también observamos pacientes con resistencias a INI + ITINANs (3%).

Sin embargo, en el caso de pacientes con carga viral entre $>4,0-5\leq \log_{10}$ cp/ml (39.6%) los niveles de cepas *wild type* fueron superiores (75%) que los niveles de resistencia a los ARVs (25%). **(Figura 4.10)** Aunque obtuvimos pacientes que presentaban resistencia a los INIs (6%) y un 3% presentaban mutaciones frente a IPs e ITINANs.

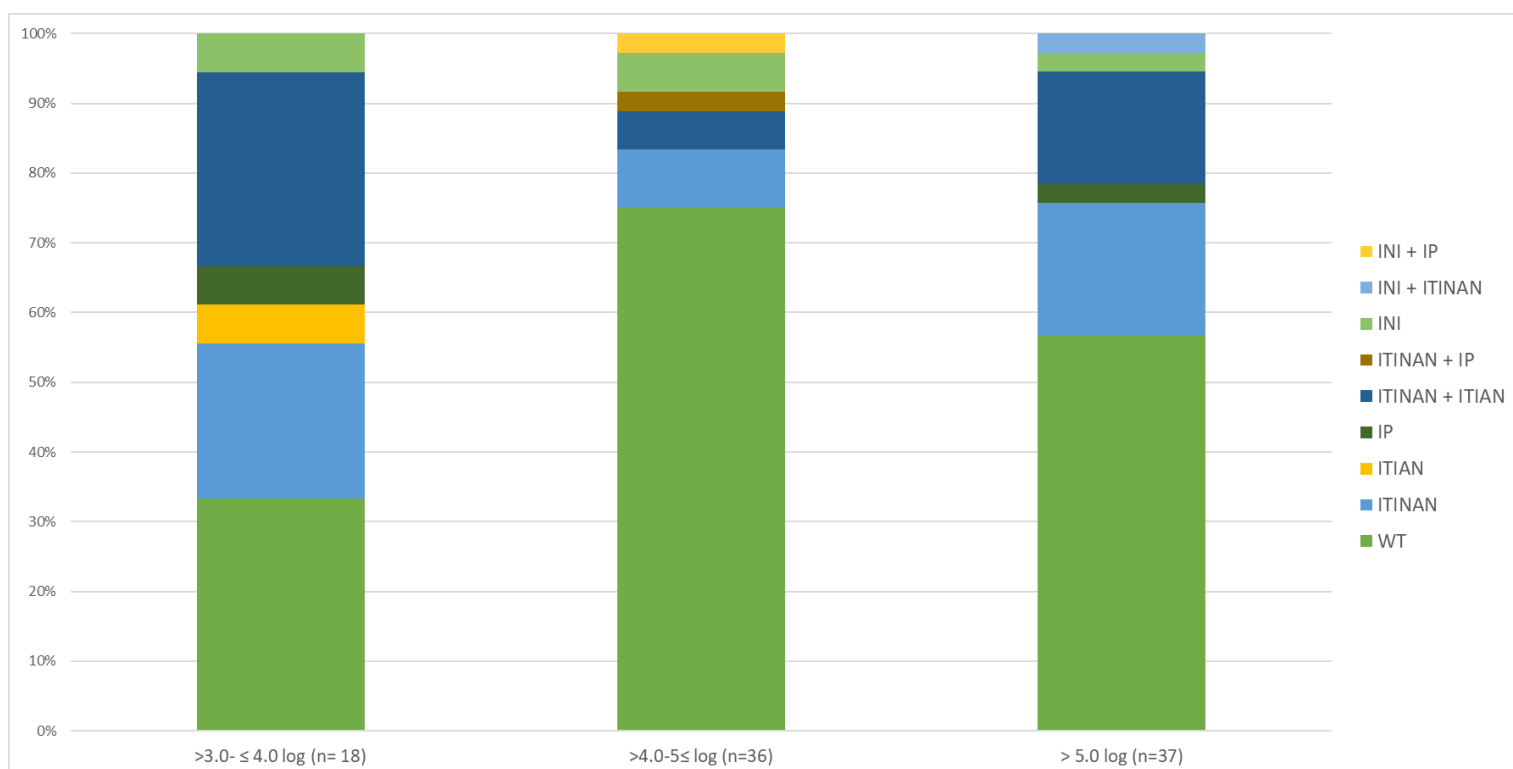


Figura 4.10 Porcentaje de las cepas de VIH-1 que albergan mutaciones de resistencia a los antirretrovirales ITIANs, ITINANs, IP e INI considerando la carga viral de los pacientes.

4.4.2.1 Análisis del gen de la transcriptasa inversa

Las mutaciones de resistencia a la transcriptasa inversa estaban presentes en 32 (37.6%) de las 85 secuencias RT analizadas. Mientras que, 22 (42,3%) de los 52 pacientes TAR experimentados albergaban estas mutaciones de resistencia. 3 (14,3%) de los 21 pacientes que no habían recibido tratamiento antirretroviral contenían mutaciones de resistencia y 7 (58,4%) muestras de los 12 pacientes desconocidos respecto a su tratamiento antirretroviral también tenían mutaciones de resistencia a los medicamentos antirretrovirales.

En general, la prevalencia de mutaciones de resistencias a ITIANs y ITINANs fue del 15.3% (13/85) y 36.5% (31/85), respectivamente. Más específicamente, entre las muestras con mutaciones de resistencia, el 37.5% (12/32) tenía mutaciones a ITIANs e ITINANs. El 59.6% (19/32) tenía mutaciones de resistencia solamente a ITINANs, y solamente 1 muestra (3.1%) tenía mutaciones a ITIAN únicamente.

Obtuvimos un total de 26 mutaciones frente los ITIANs, la mutación más frecuente fue M184V (27%) seguida de V75M, K70R y D67N (11.5%, respectivamente) (**Figura 4.11**). Las mutaciones asociadas a ITIANs estaban presentes en 19,2% (10/52) y 25% (3/12) de pacientes en TAR y pacientes cuya información de si estaban en TAR o no, era desconocida, respectivamente.

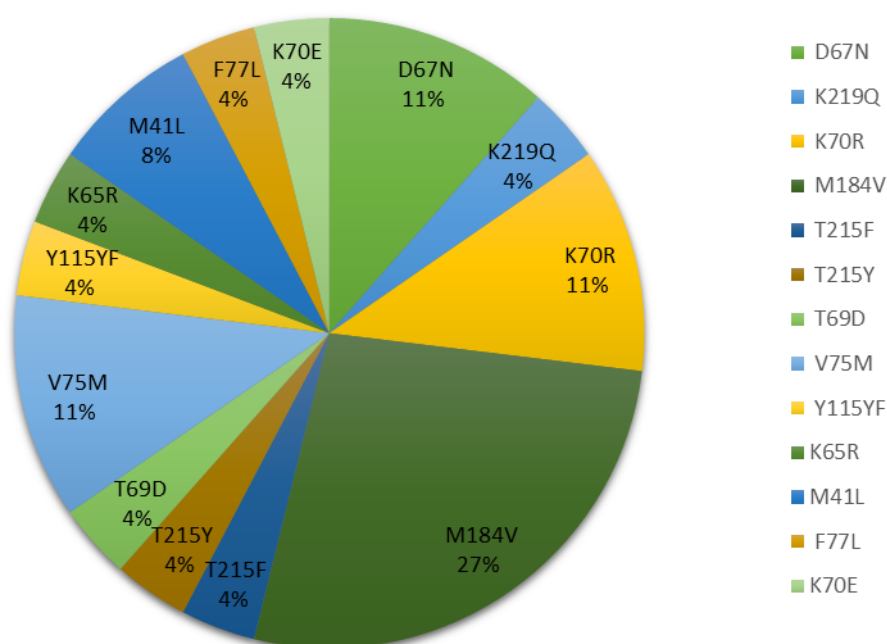


Figura 4.11 Representación de las mutaciones de resistencia frente a los inhibidores análogos de transcriptasa inversa (ITIAN) presentes en las muestras secuenciadas *pol* (RT) en los pacientes VIH-1 de Kinshasa, RDC.

Ninguna secuencia con mutaciones a los antirretrovirales análogos correspondía a pacientes naïve. En el grupo con experiencia en TAR la mutación más frecuente frente a los ITIANs fue M184V, en el 60% de las secuencias, seguido del V75M (30%). En cambio, los pacientes con información desconocida del TAR, no tenían una mutación de resistencia predominante; M184V, D67N, K70R, F77L y K70E estaban presentes en el mismo porcentaje, 33.3% ya que estaban presentes en una de las 3 muestras.

También en este grupo de mutaciones pudimos encontrar 11 mutaciones análogas a la timidina (**TAMs**) presentes en 5 de 13 (38.5%) secuencias con mutaciones de resistencia a los medicamentos ITIANs (T215F y T215Y (9,1% cada uno, 2/11) y

M41L (18,2%, 2/11), K70R y D67N (27,3%, 3/11, respectivamente) y 9,1% (1/11) K219Q. (Figura 4.12)

Mutaciones análogas de timidina (TAMs)

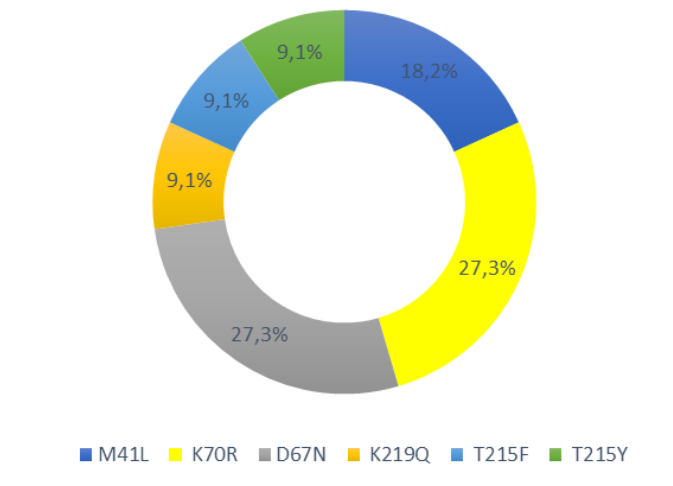


Figura 4.12 Representación de las mutaciones análogas de timidina presentes en las muestras secuenciadas *pol* (RT) en los pacientes VIH-1 de Kinshasa, RDC.

En cuanto a las mutaciones asociadas a ITINANs, obtuvimos un total de 47 mutaciones de resistencia frente a ITINANs; y vimos que la mutación más frecuente con diferencia en nuestra población de estudio fue la K103N (40.4%) seguida de la V108I (8.5%). (Figura 4.13)

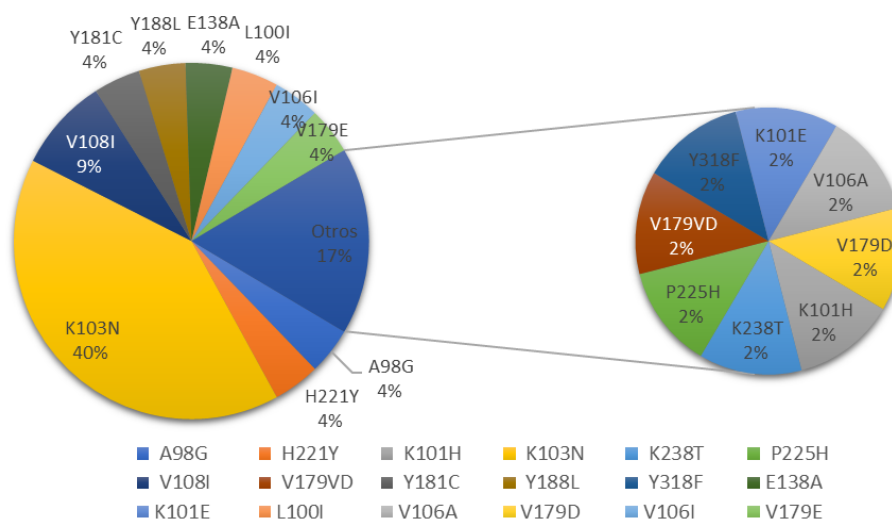


Figura 4.13 Representación de las mutaciones de resistencia frente a los inhibidores no análogos de transcriptasa inversa (ITINAN) presentes en las muestras secuenciadas *pol* (RT) en los pacientes VIH-1 de Kinshasa, RDC.

Las mutaciones de resistencia frente a los inhibidores no análogos de transcriptasa inversa estaban presentes en el 40,4% (21/52), 14,3% (3/21) y el 58,4% (7/12) de los pacientes con experiencia en previa en TAR, pacientes TAR naïve y pacientes con información de TAR desconocidos, respectivamente. La mutación asociada a ITINANs más frecuente fue K103N (61.3%, 19/31), un 66.7% (14/21) en los pacientes con experiencia en TAR, un 57.1% (4/7) en pacientes con experiencia en TAR desconocida y un 33.3% (1/3) en pacientes naïve. En general, otras DRM como V108I estuvieron presentes en menor porcentaje, un 12.9% (4/31) de las secuencias con mutaciones frente a ITINANs, principalmente en los pacientes con experiencia previa en TAR, un 9,5%.

4.4.2.2 Análisis del gen de la proteasa

Las mutaciones de resistencia a los inhibidores de proteasa estaban presentes en 6.5% (5/77) de las secuencias totales de la proteasa. Las mutaciones más frecuentes en estas secuencias fueron M46L, L10F, Q58E, L90M, I47V y I47A en el 16.7% de las secuencias cada una. De las 5 secuencias que presentaban mutaciones resistentes a los inhibidores de proteasa, observamos que el 40% (2/5) pertenecían a pacientes que se encontraban bajo tratamiento antirretroviral o habían tenido experiencia previa. No destacaba ninguna mutación en concreto, pero encontramos mutaciones importantes como L90M, M46L entre otras. Un 40% formaban parte del grupo de pacientes de los que desconocíamos su TAR o si no habían recibido tratamiento alguno; entre los cuáles hallamos diferentes mutaciones en los pacientes como **Q58E, I47V**. Solo el 20% eran pacientes naïve cuya secuencia albergaba la mutación **L10F**. (Figura 4.14)

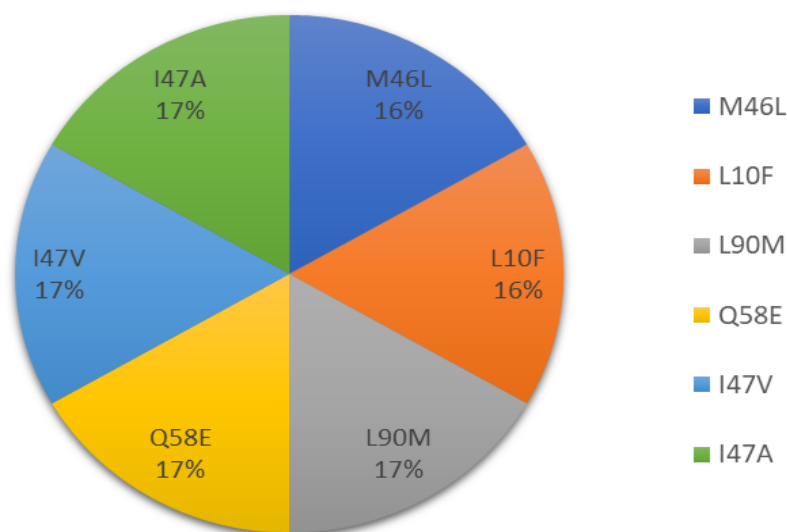


Figura 4.14 Representación de las mutaciones de resistencia frente a los inhibidores de proteasa (IP) presentes en las muestras secuenciadas *pol* (RT) en los pacientes VIH-1 de Kinshasa, RDC.

4.4.2.3 Análisis del gen de la integrasa

De las 68 secuencias disponibles de la integrasa, el 7.6% (n=5) presentaba mutaciones de resistencias frente a los inhibidores de integrasa. Entre estas secuencias, observamos que cada mutación aparecía en el 20% de los pacientes, no había ninguna mutación repetida en todas las secuencias. Al analizar las secuencias por grupo de pacientes según su TAR, obtuvimos que el 20% pertenecían a pacientes bajo TAR o con experiencia previa; el 60% a pacientes naïve y el 20% restante al grupo de pacientes cuya información del TAR es desconocida. Entre los pacientes bajo TAR (n=1) la mutación predominante era T97A. En los pacientes naïve (n=3), encontramos la misma situación que los pacientes con TAR, ninguna mutación predominante, pero si varias mutaciones principales: T66S, S153SF, N155D, cada una en un paciente distinto.

Por último, en los pacientes con información desconocida sobre el TAR (n=1) obtuvimos una única mutación de resistencia, la E157Q. **(Figura 4.15)**

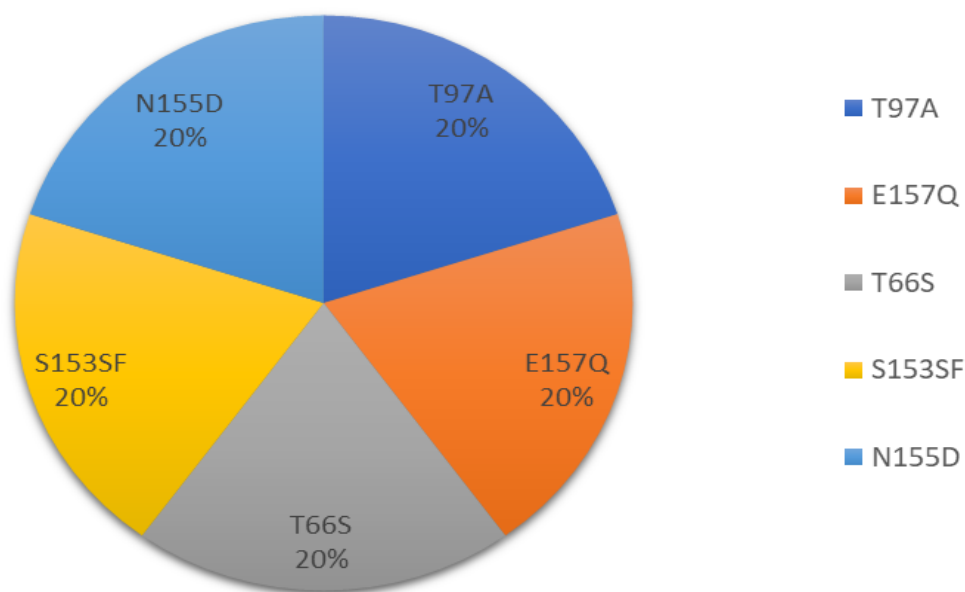


Figura 4.15 Representación de las mutaciones de resistencia frente a los inhibidores de integrasa (INI) presentes en las muestras secuenciadas *pol* (RT) en los pacientes VIH-1 de Kinshasa, RDC.

4.4.2.3.1 Polimorfismos genéticos asociados con rutas de resistencia en el gen de la integrasa

De las 68 secuencias correctamente amplificadas de los pacientes VIH-1 positivo, pudimos analizar los polimorfismos naturales existentes en los codones T66, E92, G118, E138, Y143, S147, Q148, N155D y R263 que pueden servir como vía de resistencia a los ARVs en todas ellas, principalmente pertenecían a muestras con viremia superior a 5 log cp/mL. De estas 68 cepas, el 39,7% pertenecían a 11 subtipos/CRFs diferentes y el 60.3% eran formas recombinantes únicas (URF).

Entre los polimorfismos estudiados, observamos una frecuencia variable: En el codón G118 obtuvimos que el 6% presentaba los codones GGA/GGG (URFs y A1), mientras que un 92% presentaban GGC/GGT y 1% presentaba el codón GGY. En el codón E138 obtuvimos que el 94% presentaba GAA/GAG y el 5% GAC/GAR (URFs y A1); en el codón T66 el 97% ACA/ACC y el 3% TCC/ACT; E92 casi el 96% presentaba GAA y el 4.4% GAG; en Y143, el 100% presentaba el mismo codón, TAC; en S147 el 69,1% presentaba AGT y el 30,9% AGC; en Q148 obtuvimos 2 tipos de codones, el 89,7% CAA y 10,3% CAG (subtipos C y H); en N155, el 92,6% presentaba AAT (principalmente URFs), el 5,9% AAC (subtipos A1, H y URFs) y el 1,5% GAT (URF) y finalmente en R263 el 71,6% presentaba AGA y el 28,4% AGG con los URFs como predominantes seguidos de los subtipos C y G (**Tabla 4.20**)

De las mutaciones de resistencia obtenidas, comentadas anteriormente, 2 de ellas aparecieron en estas posiciones críticas **T66S y N155D**, con los codones modificados, TCC y GAT respectivamente.

Tabla 4.20 Polimorfismos estudiados en posiciones críticas de desarrollo de mutaciones de resistencia en la integrasa en relación al subtipo.

	G118	E138K	T66	E92	Y143	S147	Q148	N155D	R263
A1	GGG	GAA	ACA	GAA	TAC	AGC	CAA	AAC	AGA
	GGC	GAC	ACT			AGT		AAT	AGG
C	GGC	GAA	ACA	GAA	TAC	AGT	CAA	AAT	AGG
	GGT						CAG		
F1	GGC	GAA	ACA	GAA	TAC	AGT	CAA	AAT	AGA
G	GGC	GAA	ACA	GAA	TAC	AGC	CAA	AAT	AGA
		GAG				AGT			
H	GGC	GAA	ACA	GAA	TAC	AGT	CAA	AAC	AGA
							CAG	AAT	AGG
J	GGC	GAA	TCC	GAA	TAC	AGT	CAG	AAT	AGA
Recombinantes**	GGC	GAA	ACA	GAA	TAC	AGC	CAA	AAT	AGA
	GGT			GAG					AGG
URFs ***	GGA	GAA; GAG; GAC; GAR	ACA	GAA	TAC	AGC	CAA	AAC; AAT	AGA
			ACC	GAG		AGT	CAG	GAT	AGG

Tabla 4.21 Codones de los polimorfismos estudiados en posiciones críticas de desarrollo de mutaciones de resistencia en la integrasa (n= 68).

CODONES	GAA	GAG	GAC	GAT	GAR
E138	88%	6%	4%	0%	1%
	GGA*	GGG*	GGC	GGT	GGY
G118	3%	3%	76%	16%	1%
	ACA	ACC	ACG	ACT	TCC
T66	96%	1%	0%	1%	1%
	GAA	GAC	GAG	GAT	
E92	96%	0%	4%	0%	
	TAA	TAC	TAG	TAT	
Y143	0%	100%	0%	0%	
	AGA	AGC	AGG	AGT	
S147	0%	31%	0%	69%	
	CAA	CAC	CAG	CAT	
Q148	90%	0%	10%	0%	
	AAA	AAC	AAG	AAT	GAT
N155	0%	6%	0%	93%	1%
	AGA	AGC	AGG	AGT	
R263	72%	0%	28%	0%	

4.4.3 Predicción de los niveles de resistencia de VIH-1 en Kinshasa

Se analizaron los patrones de mutaciones de resistencias de las secuencias de proteasa, RT e integrasa obtenidos mediante la herramienta de Stanford para evaluar los diferentes niveles de resistencia de las secuencias disponibles que contenían mutaciones de resistencia frente a los distintos antirretrovirales. De las 230 secuencias disponibles entre las 3 dianas analizadas (RT, PR, INT) hemos observado una mayor tasa de resistencia a los ARVs inhibidores de la retrotranscriptasa que a los inhibidores de integrasa o proteasa.

En la **Figura 4.16** podemos observar con más detalle la predicción global de los niveles de resistencia a los ARVs de las diferentes clases.

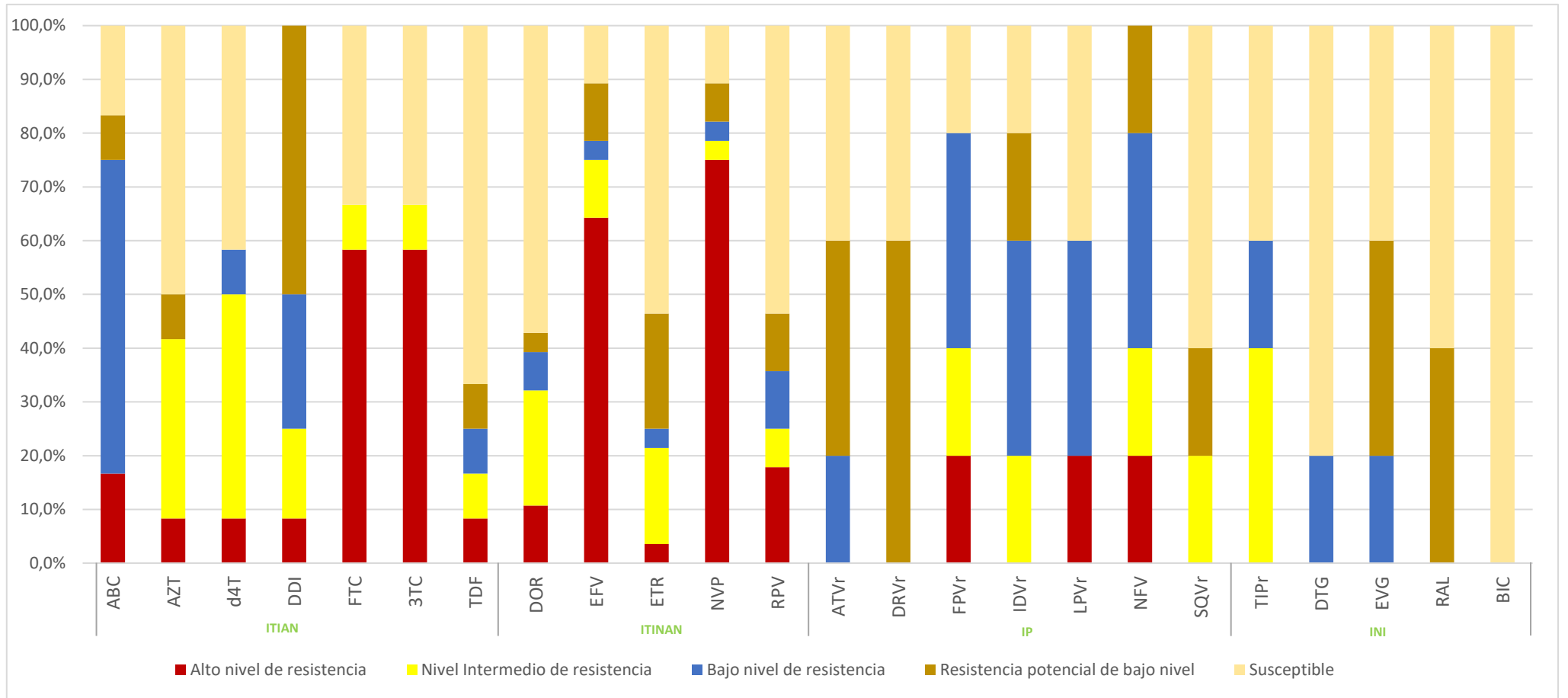


Figura 4.16 Predicción de la sensibilidad a fármacos antirretrovirales según Stanford en pacientes con secuencias pol disponibles (n=111).

4.4.3.1 Análisis del gen de la transcriptasa inversa

En las secuencias obtenidas de la RT (n=32), 8 de 13 (61.5%) secuencias con mutaciones de la resistencia de ITIANs confirieron resistencia de alto nivel por lo menos a una droga en esta clase de ARV. La mutación más frecuente fue M184V sola o en combinación con otras mutaciones de resistencia (53.8%, 7/13) lo que resultó en resistencia de alto nivel a lamivudina/emtricitabina, resistencia de bajo nivel a abacavir, susceptibilidad a AZT y potencial resistencia de bajo nivel a la didanosina. El patrón de mutación M41L-D67N-K70R-V75M-M184V-T215F-K219Q presentaba resistencia de alto nivel para todos los fármacos de esta clase a excepción de TDF con resistencia de nivel intermedio, siendo el patrón mutacional con mayor tasa de resistencia. **(Tabla 4.22)**

Por otro lado, de las 10 secuencias con mutaciones asociadas a ITIANs de pacientes con experiencia en TAR, 6 (60%) exhibieron resistencia de alto nivel a lamivudina y emtricitabina. Las secuencias presentaban el menor nivel de resistencia frente al abacavir con 5 (50%) secuencias, cada una exhibiendo resistencia de bajo nivel, 1 (10%) resistencia potencial de bajo nivel y 2 (20%) secuencias con susceptibilidad. Sólo el 20% (2/10) de las muestras fueron resistentes al TDF. Entre los pacientes cuyos datos del TAR que desconocíamos, solamente 3 secuencias tenían mutaciones ITIANs asociadas. Uno tenía resistencia de alto nivel a la lamivudina (3TC) y a emtricitabina (FTC) y susceptibilidad a TDF, pero todos tenían resistencia de bajo nivel al abacavir (ABC) **(Tabla 4.22)**.

En cuanto a las mutaciones que confieren resistencia de alto nivel al menos a un fármaco de la clase ITINAN, estuvieron presentes en el 71% (22/31) de las secuencias. En el grupo de pacientes con experiencia en TAR, entre las 21 secuencias con mutaciones asociadas a ITINANs de pacientes con experiencia en TAR, 15 (71.4%) y 13 (61.9%) mostraron resistencia de alto nivel a nevirapina y efavirenz respectivamente. la mutación más común fue K103N, el 33.3% de los sujetos con experiencia en TAR presentaban únicamente como mutación única y principal, K103N, con resistencia de alto nivel para NVP y EFV; pero presente en el 66.7% (14/21) sola o en combinación con otras mutaciones. Frente a Rilpivirina (RPV) y Etravirina (ETR) se mostraban menores niveles de resistencia, pero el 19% de las secuencias mostraban una resistencia de alto nivel a RPV.

Los patrones de mutaciones frente a ITINANs con mayor nivel de resistencia a esta clase de antirretroviral eran L100I-K103N-H221Y; A98G-K103N-Y181C que mostraron resistencia de alto nivel a todos los antirretrovirales no análogos EFV, NVP y RPV, pero con una resistencia de nivel intermedio a ETR; y el patrón V179VD-Y188L

que presentaba alto nivel de resistencia a todos los ITINANs excepto a EFV, presentando un nivel intermedio de resistencia. (**Tabla 4.23**)

Tabla 4.22 Patrones de resistencia de cepas de VIH-1 con mutaciones de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa de nucleósidos (ITIANs) (n=13).

Patrones mutacionales	Perfil de resistencia a los antirretrovirales							
	n (%)	ABC	AZT	d4T	DDI	FTC	3TC	TDF
Pacientes con experiencia en TAR (n=10)								
M184V, V179VD, Y188L	1 (10)	BNR	S	S	RPBN	ANR	ANR	S
K65R, V75M, Y115YF, L100I, K103N, H221Y	1 (10)	ANR	S	ANR	ANR	NIR	NIR	ANR
K70R, K101H	1 (10)	S	NIR	BNR	RPBN	S	S	S
M184V, T215Y, A98G, K103N, Y181C	1 (10)	BNR	NIR	NIR	BNR	ANR	ANR	S
A98G, K103N, V108I, M184V	1 (10)	BNR	S	S	RPBN	ANR	ANR	S
M184V, K103N, P225H, K238T	1 (10)	BNR	S	S	RPBN	ANR	ANR	S
M41L, D67N, K70R, V75M, M184V, T215F, K219Q, K103N, V108I, Y318F	1 (10)	ANR	ANR	ANR	ANR	ANR	ANR	NIR
M41L, D67N, T69D, V106A	1 (10)	RPBN	NIR	NIR	NIR	S	S	RPBN
L100I, K103N, H221Y, V75M	1 (10)	S	RPBN	NIR	BNR	S	S	S
M184V	1 (10)	BNR	S	S	RPBN	ANR	ANR	S
Pacientes sin datos de TAR (n=3)	n (%)							
D67N, K70R, F77L, K103N	1 (33.3)	BNR	NIR	NIR	BNR	S	S	BNR
M184V, K103N, V108I	1 (33.3)	BNR	S	S	RPBN	ANR	ANR	S
K70E	1 (33.3)	BNR	S	BNR	BNR	RPBN	RPBN	BNR

* ANR: Alto nivel de resistencia; BNR: Bajo nivel de resistencia; NIR: Nivel intermedio de resistencia; RPBN: Resistencia potencial de bajo nivel; S, susceptible. * (Algunos patrones mutacionales pertenecen a secuencias que incluyen mutaciones frente a ITIANs).

Entre los pacientes naïve de TAR (3/31), una de las secuencias que presentaba una sola mutación frente a ITIANs (Y181C), mostró el nivel más alto de resistencia

frente a esta clase de antirretroviral, más concretamente, mostraba resistencia de nivel intermedio frente a todos los antirretrovirales no análogos a excepción de la NVP con una resistencia de alto nivel. Sin embargo, otro paciente solo mostraba resistencia EFV y NVP a niveles altos. Solo uno de los pacientes con la mutación V108I mostraba signos de resistencia clara frente a Doravirina (DOR) pero a bajo nivel.

Tabla 4.23 Patrones de resistencia de cepas de VIH-1 con mutaciones de resistencia a los inhibidores de transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINANs) (n=31).

Patrones mutacionales	Perfil de resistencia a los antirretrovirales					
	Pacientes con experiencia en TAR (n=21)	n (%)	DOR	EFV	ETR	NVP
K103N	7 (33.3)	S	ANR	S	ANR	S
K103N	1 (4.8)	S	S	S	S	S
K101E	1 (4.8)	BNR	BNR	BNR	NIR	NIR
V179D	1 (4.8)	S	RPBN	RPBN	RPBN	RPBN
E138A	2 (9.5)	S	S	RPBN	S	BNR
A98G, K103N, V108I, M184V	1 (4.8)	NIR	ANR	RPBN	ANR	BNR
K65R, V75M, Y115YF, L100I, K103N, H221Y	1 (4.8)	NIR	ANR	NIR	ANR	ANR
K70R, K101H	1 (4.8)	S	RPBN	RPBN	BNR	RPBN
L100I, K103N, H221Y, V75M	1 (4.8)	NIR	ANR	NIR	ANR	ANR
M184V, K103N, P225H, K238T	1 (4.8)	NIR	ANR	S	ANR	S
M184V, T215Y, A98G, K103N, Y181C	1 (4.8)	NIR	ANR	NIR	ANR	ANR
M184V, V179VD, Y188L	1 (4.8)	ANR	ANR	BNR	ANR	ANR
M41L, D67N, K70R, V75M, M184V, T215F, K219Q, K103N, V108I, Y318F	1 (4.8)	NIR	ANR	S	ANR	S
M41L, D67N, T69D, V106A	1 (4.8)	ANR	NIR	S	ANR	S
Pacientes naïve (n=3)	n (%)					
K103N	1 (33.3)	S	ANR	S	ANR	S
Y181C	1 (33.3)	RPBN	NIR	NIR	ANR	NIR
V108I	1 (33.3)	BNR	RPBN	S	BNR	S
Pacientes sin datos de TAR (n=7)	n (%)					
D67N, K70R, F77L, K103N	1 (14.3)	S	ANR	S	ANR	S

V179E	1 (14.3)	S	RPBN	RPBN	RPBN	RPBN
M184V, K103N, V108I	1 (14.3)	BNR	ANR	S	ANR	S
K103N	1 (14.3)	S	ANR	S	ANR	S
V106I, V179E, Y188L	1 (14.3)	ANR	ANR	NIR	ANR	ANR
K70E, K103N	1 (14.3)	S	ANR	S	ANR	S
V106I	1 (14.3)	RPBN	S	RPBN	RPBN	RPBN

*ANR: alto nivel de resistencia; BNR: bajo nivel de resistencia; NIR: nivel intermedio de resistencia; RPBN: resistencia potencial de bajo nivel; S: susceptible. * (Algunos patrones mutacionales pertenecen a secuencias que incluyen mutaciones frente a ITINANs)

En general, el 38.7% presentaba niveles significativos de resistencia frente a DOR, el 19.4% presentaba niveles intermedios de resistencia, pero un 9.7% presentaba niveles altos de resistencia frente a este ARV.

Las 7 secuencias de pacientes con datos desconocidos de su experiencia en TAR (7/31), mostraban que un 71.4% (5/7) tenía resistencia de alto nivel a EFV y NVP. Un 14.3% (1/7) presentaba resistencia de alto nivel a todos los fármacos ITINANs excepto ETR que mostró una resistencia de nivel intermedio. El 28.6% mostraron una resistencia potencial de bajo nivel a todos los ARVs ITINANs, excepto en dos ARVs, una muestra frente a DOR y otra frente a EFV (**Tabla 4.23**) El patrón de mutación V106I-V179E-Y188L mostró los niveles más altos de resistencia entre estas muestras con una resistencia de alto nivel a todos los fármacos ITINANs excepto a la ETR con una resistencia de nivel intermedio.

4.4.3.2 Análisis del gen de la proteasa

Respecto a la proteasa, observamos que las 5 secuencias con mutaciones de resistencia a los inhibidores de proteasa (IP) pertenecían a todos los grupos de pacientes de nuestro estudio: el 40% pertenecía a los pacientes con experiencia en TAR, otro 40% pertenecía los pacientes sin datos sobre si estaban en TAR o no y el 20% a pacientes naïve.

La secuencia que contenía las mutaciones no polimórficas seleccionadas por IPs (M46L e I47A) conferían una resistencia de alto nivel a Lopinavir/ritonavir (LPVr) y potencial resistencia de bajo nivel a atazanavir (ATV) y darunavir (DRV). Las mutaciones demostraron resistencia de bajo nivel potencial a ATZ/r y a DRV/r. Un 60% de las secuencias con otras mutaciones no-polimórficas (L90M, L10F, Q58E) tenían susceptibilidad a DRVr. Pero también tenían resistencia de bajo nivel y/o potencial de

resistencia de bajo nivel ATZ/r y LPV/r. No se detectaron otros niveles de resistencia frente a otros IPs. **(Tabla 4.24)**

Tabla 4.24 Patrones de resistencia de cepas de VIH-1 con mutaciones de resistencia a los inhibidores de proteasa (n=5).

Patrones mutacionales									
Pacientes con experiencia en TAR (n=2)	n (%)	ATVr	DRVr	FPVr	IDVr	LPVr	NFV	SQVr	TIPr
M46L, I47A	1 (50)	RPBN	RPBN	ANR	BNR	ANR	NIR	RPBN	NIR
L90M	1 (50)	BNR	S	BNR	NIR	BNR	ANR	NIR	S
Pacientes naïve (n=1)	n (%)								
L10F	1 (100)	S	S	BNR	RPBN	S	BNR	S	S
Pacientes sin datos TAR (n=2)	n (%)								
Q58E	1 (50)	S	S	S	S	S	RPBN	S	BNR
I47V	1 (50)	RPBN	RPBN	NIR	BNR	BNR	BNR	S	NIR

*ANR: Alto nivel de resistencia; BNR: Bajo nivel de resistencia; NIR: Nivel intermedio de resistencia; RPBN: Resistencia potencial de bajo nivel; S: susceptible. * (Algunos de los patrones de resistencias pertenecen a secuencias que incluyen mutaciones frente a ITIANs)

4.4.3.3 Análisis del gen de la integrasa

La resistencia frente a los inhibidores de integrasa de las secuencias obtenidas (n=5) del análisis mediante la herramienta de Stanford, no mostraba un nivel alto de resistencia frente a los antirretrovirales. Evaluamos la resistencia a los antirretrovirales Dolutegravir (DTG), Elvitegravir (EVG), Raltegravir (RAL) y Bictegravir (BIC). El 60% de las secuencias con mutaciones resistentes pertenecían al grupo de pacientes naïve mientras que el 20% pertenecía a al grupo de pacientes con experiencia a TAR y otro 20% al grupo de cuyo TAR desconocíamos. El 80% de todos los sujetos presentaba susceptibilidad de resistencia al dolutegravir (DTG) y el 20% restante tenía un nivel bajo de resistencia; respecto a elvitegravir (EVG) el 40% tenía un potencial bajo nivel de resistencia, un 20% tenía bajo nivel de resistencia y otro 40% de las secuencias presentaban susceptibilidad. Frente a raltegravir (RAL), un 60% de las secuencias presentaban susceptibilidad de resistencia.

Si analizamos la resistencia los inhibidores de integrasa mediante los patrones de mutaciones podemos observar que la mutación S153SF presentaba el mayor nivel de resistencia respecto al resto ya que presentaba bajo nivel de resistencia a DTG y

EVG, pero susceptibilidad a RAL; aunque las secuencias de integrasa con la mutación E157Q y T97A presentaban cierto riesgo de desarrollar bajo nivel de resistencia a EVG y RAL. **(Tabla 4.25)**. Todas las muestras presentaban susceptibilidad al antirretroviral bicitegravir, sin embargo, dos de los sujetos naïve presentaban susceptibilidad de resistencia a todos los INIs.

Tabla 4.25 Patrones de resistencia de cepas de VIH-1 con mutaciones de resistencia a los inhibidores de integrasa (n=5).

Patrones mutacionales					
Pacientes con experiencia en TAR (n=1)	n (%)	DTG	EVG	RAL	BIC
T97A	1 (100%)	S	RPBN	RPBN	S
Pacientes naïve (n=3)	n (%)				
T66S	1 (33.3%)	S	S	S	S
S153SF	1 (33.3%)	BNR	BNR	S	S
N155D	1 (33.3%)	S	S	S	S
Pacientes sin datos TAR (n=1)	n (%)				
E157Q	1 (100%)	S	RPBN	RPBN	S

*Abreviaturas: ANR: Alto nivel de resistencia; BNR: Bajo nivel de resistencia; NIR: Nivel intermedio de resistencia; RPBN: Resistencia potencial de bajo nivel; NR: No resistencia detectada; S: susceptible. * (Algunos de los patrones de resistencias pertenecen a secuencias que incluyen mutaciones frente a ITIANs)

4.5 Adherencia al tratamiento antirretroviral y asociación con el desarrollo de mutaciones de resistencia en Kinshasa

El estudio de adherencia nos ha proporcionado datos acerca de la dificultad de los pacientes para llevar adecuadamente las pautas de la medicación (**Tabla 4.26**). Obtuvimos un total de 162 pacientes VIH+ con experiencia en TAR y 33 pacientes desconocidos que podrían tener experiencia en TAR. Obtuvimos información de la adherencia del 96.3% de los 162 pacientes bajo TAR y el 30.3% de los pacientes desconocidos, obteniendo un total de 166 pacientes para el estudio de adherencia.

En primer lugar, en relación con el tiempo que tardaban en llegar a su centro de salud más cercano para recibir la terapia antirretroviral, la mayoría de los pacientes en tratamiento antirretroviral declararon estar a más de 60 minutos a pie (81%). En cuanto al inicio de cuando comenzaron a saltarse dosis del TAR, casi el 30% de los pacientes afirmaron haber omitido dosis desde hace pocos meses, aunque más de la mitad afirmaban no haberse saltado ninguna dosis. En relación a su capacidad para tomar la medicación, valorada en una escala del 1 al 10, la gran mayoría (88%) informó de una puntuación de 6 a 10, lo que consideramos una buena capacidad para la toma del antirretroviral. Sin embargo, durante la semana anterior un 37% habían admitido no haber tomado la medicación entre 1 y 6 días de la semana.

Tabla 4.26 Acceso y adherencia al tratamiento antirretroviral de los pacientes VIH+ con experiencia en TAR (pacientes TAR y desconocidos con TAR).

Duración del camino al centro ARV (n=166)	n	%	Días de la semana sin tomar ARVs (n=164)	n	%
<15 minutos	3	2%	Nunca	104	63%
15-30 minutos	12	7%	1 día	21	13%
30-60 minutos	16	10%	2 días	15	9%
>60 minutos	135	81%	3 días	7	4%
			3-6 días	9	5%
			Todos los días	8	5%
Dosis omitida (n=164)	n	%	Capacidad de tomar la dosis indicada por cuenta propia (Rango: 1-10) (n=165)	n	%
Nunca	92	56%	0-5	19	11,5%
Pocas semanas	13	8%	6-10	145	87,9%
Unos pocos meses	45	27%	Dudas	1	0,6%
No lo sé	14	9%			

Observamos que, entre los pacientes con mejores resultados de adherencia, el 60.1% había admitido tener una capacidad para tomarse las dosis indicadas correctamente y nunca habían omitido una dosis, ni siquiera la semana anterior. Sin embargo, entre estos pacientes el 10.3% habían desarrollado mutaciones de resistencia. Por esta razón, estudiamos la asociación entre el desarrollo de mutaciones de resistencia y la adherencia al tratamiento antirretroviral.

Tabla 4.27 Mutaciones de resistencia asociadas a las variables de adherencia estudiadas.

¿A cuántos minutos a pie está el lugar de distribución de medicamentos antirretrovirales más cercano a tu casa?	RT (n)	K103N (n)	M184V (n)	PR (n)	INT (n)
<15 minutos	0	0	0	0	0
15-30 minutos	3	0	1	1	0
30-60 minutos	5	5	2	0	0
>60 minutos	15	9	2	1	1
En una escala de 0 a 10, califique su capacidad para tomar los medicamentos exactamente como se le indicó.	RT (n)	K103N (n)	M184V (n)	PR (n)	INT (n)
0-5	5	4	1	0	0
6 a 10	18	10	4	2	1
Durante la última semana, ¿cuántas veces se olvidó de tomar sus medicamentos?	RT (n)	K103N (n)	M184V (n)	PR (n)	INT (n)
Nunca	11	6	3	0	1
1 día	3	3	0	0	0
2 días	5	2	1	2	0
3 días	0	0	0	0	0
3-6 días	0	0	0	0	0
todos los días	4	3	1	0	0
¿Cuándo empezó a saltarse las dosis?	RT (n)	K103N (n)	M184V (n)	PR (n)	INT (n)
Nunca	9	6	2	0	1
Pocas semanas	0	0	0	0	0
Pocos meses	9	6	1	1	0
No lo sé	5	2	2	1	0

* n=pacientes.

Observamos K103N y M184V como mutaciones más prevalentes, entre los pacientes con una mayor duración del camino a lugar más cercano de distribución de medicamentos, de 30 a más de 60 minutos y entre los pacientes que se habían saltado dosis desde hace meses. En cambio, en los pacientes con mejor puntuación de toma de medicación por cuenta propia y aquellos que no

Obtuvimos que el 14.5% de los pacientes habían desarrollado alguna mutación de resistencia frente a RT, PR y/o INT. Entre estos pacientes, 23 habían desarrollado mutaciones frente a RT y dos de estos pacientes a su vez habían desarrollado también

mutaciones de resistencia frente a PR, pero solo 1 paciente tenía mutaciones frente a INT. Obtuvimos un total de 24 pacientes con mutaciones de resistencia.

Como se puede ver en detalle en **la Tabla 4.27**, encontramos que el 67% de los pacientes con mutaciones de resistencia tardaban más de una hora en llegar al centro de salud más cercano. Sin embargo, en las demás variables estudiadas observamos que el 79,2% de los pacientes con mutaciones de resistencia afirmaba tener una capacidad de automedicación alta. Además, obtuvimos que el 50% de los pacientes habían olvidado tomarse alguna dosis, presentaban mutaciones de resistencia y habían admitido no haber tomado la dosis de ARVs en 1 (12,5%), 2 (20,8%) o durante todos los días (16,7%) de la semana anterior y también habían empezado a saltarse las dosis hace pocos meses (37,5%) o no se acordaban (20,8%). Obtuvimos que las mutaciones más prevalentes entre estos pacientes fueron K103N (58%), M184V (21%) y V75M, A98G, D67N, T215Y, V179E, V179D, E138A, M41L, K101H, K70R, Y115YF, L100I, H221Y con un 8% respectivamente.

La mutación K103N fue la mutación más prevalente, y entre los pacientes con los valores más bajos de adherencia obtuvimos: entre los pacientes que tardaban más de 60 minutos en llegar al centro de salud más cercano encontramos que la mutación K103N estaba presente en un 56% de las muestras; en aquellos pacientes que habían olvidado tomar dosis de ARVs todos los días durante la semana anterior observamos que la mutación K103N tenía una prevalencia del 67%; en los pacientes que llevaban meses omitiendo dosis de ARVs observamos una prevalencia del 57% de K103N y en los pacientes con valores entre 0-5 de capacidad de medicarse correctamente encontramos que el 80% tenía esta mutación. Además de esta mutación encontramos otras menos prevalentes como K70R, D67N, L100I. En cambio, M184V apareció en 5 pacientes de los cuáles todos excepto dos tenían una mala adherencia: uno de ellos afirmó que omitía dosis de hace meses, pero no correspondía con su alta capacidad de medicarse correctamente. El otro paciente tenía una adherencia más baja ya que no sabía cuando había dejado de omitir dosis y su capacidad de medicarse correctamente era de un 2 de 10 en la escala de valoración e incluso no había tomado las dosis correspondientes ningún día de la última semana.

Entre las mutaciones frente a los inhibidores de proteasa observamos una prevalencia del 4.2% de L90M y M46L e I47A en dos pacientes, respectivamente; los cuales tenían una baja adherencia ya que ambos habían olvidado tomar dosis dos días en la semana anterior; uno de ellos había olvidado cuando había empezado a saltarse dosis y el otro hacía meses que lo hacía.

La prevalencia de mutaciones de integrasa asociadas a la adherencia fue del 4.2%. La mutación T97A pertenecía a un paciente sin mutaciones frente a RT y/o PR cuya adherencia en principio fue buena ya que tenía los mejores valores de todas las variables excepto que la duración hasta un centro de salud cercano era de más de 60 minutos. Sin embargo, entre los 12 pacientes con mutaciones de resistencia que habían afirmado no saltarse ninguna dosis durante la semana anterior, también afirmaron tener buena adherencia no omitiendo dosis, excepto 3 pacientes, de los cuales 2 no sabían desde cuando y uno desde hace pocos meses. Sin embargo, todos habían confirmado tener una buena capacidad de tomarse la medicación correctamente por su cuenta, aunque el 75% tenían el centro de salud más cercano a más de 60 minutos.

Se realizó un análisis de regresión multivariante en 90 pacientes de nuestra cohorte de pacientes VIH+. La **Figura 4.17** muestra los resultados obtenidos de los modelos realizados para estudiar la asociación entre la falta de adherencia, carga viral, niveles de CD4 y el desarrollo de las mutaciones de resistencia K103N y M184V. Obtuvimos que había asociación entre la falta de adherencia al tratamiento antirretroviral y el desarrollo de la mutación K103N al contrario que con la mutación M184V. Además, obtuvimos resultados significativos respecto a la alta carga viral ($> 4\log_{10}$) y el olvido de tomarse la medicación más de un día a la semana y también cuando los valores de tomarse la medicación por cuenta propia eran peores. Sin embargo, no hubo resultados significativos de asociación entre bajos niveles de CD4+ y el olvido de tomar la medicación más de un día a la semana y la capacidad de tomarse la medicación por cuenta propia.

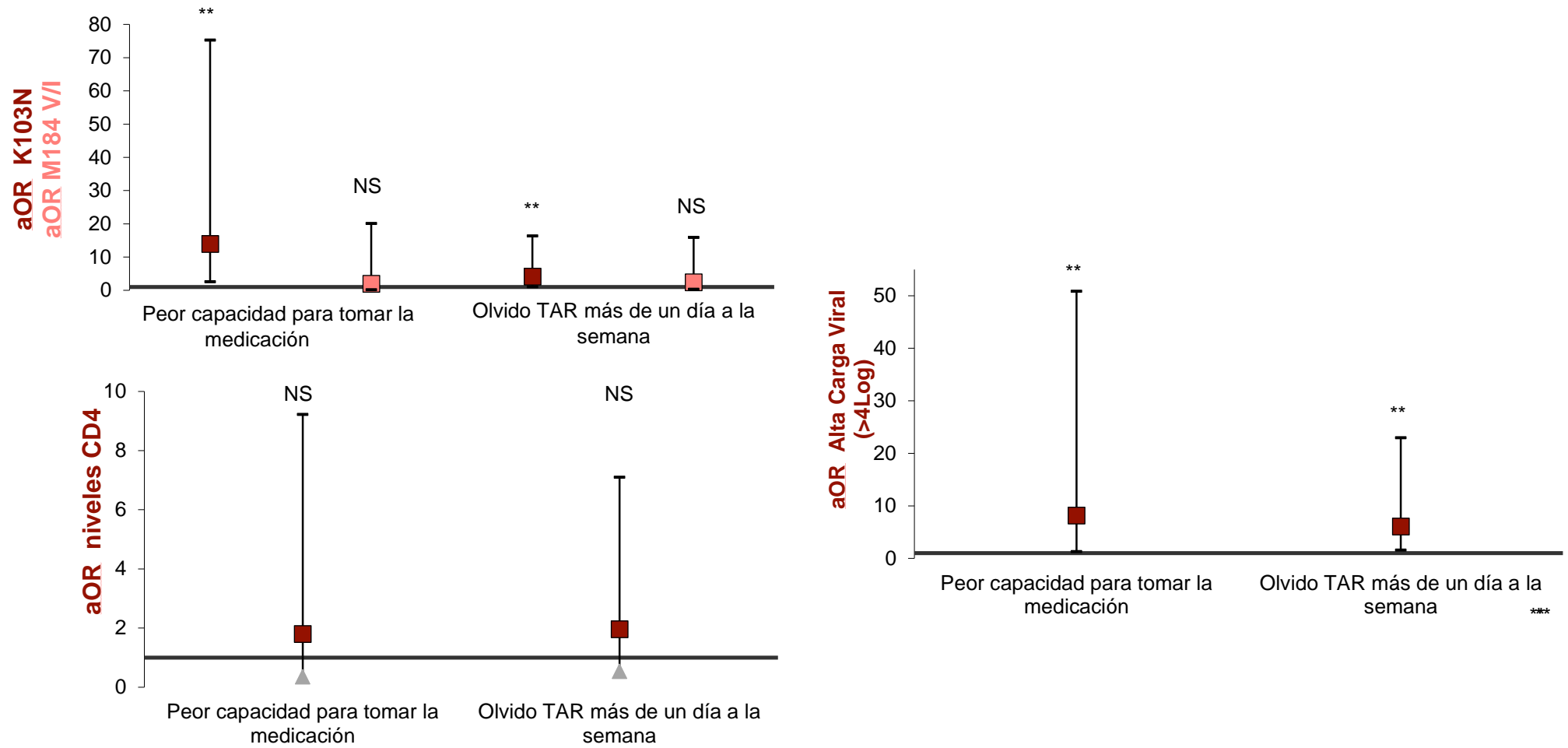


Figura 4.17 Asociación entre la adherencia y la prevalencia de las mutaciones K103N y M184V (arriba izquierda), los niveles de CD4 (abajo izquierda) y la carga viral (derecha)

5 DISCUSIÓN

5.1 Diagnóstico serológico a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa.

La OMS ha propuesto y recomendado las pruebas de diagnóstico rápido (PDR) para los países de renta baja debido al coste y a la falta de disponibilidad de otras técnicas; recomiendan tres PDR positivas consecutivas en entornos de baja prevalencia (Eaton et al., 2017) como la RDC, con una prevalencia estimada inferior al 1%. El rendimiento de las PDR dentro de una estrategia de pruebas recomendada por la OMS y un algoritmo de pruebas validado ha demostrado ser altamente fiable en diferentes países y entornos de África (Dupwa et al., 2019) pero es necesario diseñar algoritmos de pruebas precisos específicos de la región. La mayoría de los kits de PDR para VIH disponibles en África Sub-Sahariana se han evaluado como ensayos individuales y no como algoritmos de pruebas; por lo tanto, cada país debe elegir y estandarizar su propio algoritmo de pruebas en función del coste local, los problemas de almacenamiento, los recursos humanos, las instalaciones e infraestructuras disponibles, la demanda de servicios o la geografía local (Kaleebu et al., 2018; Plate & Wiktor, 2007). Por otra parte, en los últimos años los DBS han demostrado ser una alternativa fiable y menos costosa para el diagnóstico del VIH-1 en países en vías de desarrollo. Su uso se ha propuesto como una alternativa al plasma/suero, al ser más fácil de recolectar, almacenar y enviar, muy apropiado en países de recursos escasos (de Mulder & Holguín, 2013; Fernández McPhee et al., 2015; Rubio-Garrido et al., 2019; Schmitz et al., 2016; Stefic et al., 2020; World Health Organization, 2014). El objetivo del presente trabajo fue evaluar en muestras de población adulta de Kinshasa (República Democrática del Congo) la capacidad de los DBS para el diagnóstico del VIH mediante diferentes tests serológicos y comparar los resultados con las pruebas de diagnóstico rápido (PDR) realizadas a nivel local en muestras de sangre. Se analizaron muestras de pacientes infectados por el VIH en fallo virológico, sujetos naïve e individuos no infectados.

El estudio serológico realizado a la población de estudio reveló un número importante de pacientes que habían recibido un **diagnóstico incorrecto de VIH *in situ*** y que incluso habían iniciado la terapia antirretroviral. El algoritmo utilizado en Kinshasa incluye el uso de 3 PDR para el diagnóstico y la confirmación del VIH. Sin embargo, las PDR no son la opción óptima para la confirmación del diagnóstico, aunque este algoritmo es mejor que otros utilizados en muchos países como el algoritmo de

desempate, que ha demostrado tener más resultados falsos positivos (Shanks et al., 2015).

En nuestra población de estudio, 23 muestras pertenecían a individuos que habían recibido un diagnóstico de VIH indeterminado basado en las PDR en la RDC. Entre ellos, 3 pacientes estaban realmente infectados por el VIH y tenían ARN detectable según el análisis de los DBS, pero sólo uno (una mujer de 25 años) estaba recibiendo TAR con TDF/EFV/3TC. Sin embargo, sospechamos que los otros 2 pacientes indeterminados estaban recibiendo tratamiento antirretroviral debido al bajo nivel de carga viral obtenido en nuestro laboratorio.

Por otro lado, 11 muestras (3,6%) de 9 pacientes diferentes inicialmente clasificadas como positivas en origen resultaron negativas tras el análisis serológico y molecular de los DBS. Tres de las muestras falsas positivas correspondieron a un paciente, diagnosticado erróneamente en 2016 con un nivel de CD4 elevado (925-1029 CD4/ μ L), cuya terapia ARV fue retirada tras dos años de tratamiento innecesario. Estos resultados podrían explicarse bien por el mal funcionamiento del algoritmo de las pruebas rápidas utilizadas o por el mal funcionamiento de las muestras de DBS. Las pruebas inmunocromatográficas rápidas para el VIH se recomiendan en entornos de bajos recursos debido a la escasa infraestructura y a las limitaciones geográficas, pero la baja prevalencia del VIH entre la población general en la RDC (0,7%) puede estar asociada a un menor valor predictivo positivo de estos métodos (Dupwa et al., 2019; Eaton et al., 2017; Lasry et al., 2019; Rubio-Garrido et al., 2019; Tan et al., 2016; UNAIDS, 2020). En el diagnóstico erróneo también pueden influir las pruebas de lectura subjetivas, no respetar el tiempo de incubación o el etiquetado incorrecto. Las PDR de 4ª generación utilizadas en los algoritmos de diagnóstico del VIH han dado lugar a un número significativo de falsos positivos. Varios autores han evaluado el diagnóstico basado en PDR utilizando el ensayo *Determine HIV 1/2 (Abbott)* y han detectado hasta un 31,5% de falsos positivos (Kosack, Page, et al., 2017; Kosack, Shanks, Beelaert, Benson, Savane, Ng'Ang'A, et al., 2017). Otros estudios han informado de falsos positivos en Zimbabwe, un 3,5% de personas estaban recibiendo TAR sin estar infectados (S. Gregson et al., 2021). En Uganda, un estudio en un área con alta prevalencia del VIH, tres de los PDR para VIH más comúnmente utilizados (*Determine™*, *STAT PAK®*, y *Uni-Gold™*) reveló inexactitudes en los resultados. Aproximadamente el 45% de los pacientes que recibieron resultados positivos para el VIH eran erróneos (Armstrong-Mensah et al., 2020). Entre 2004 y 2005, el personal de

Médicos Sin Fronteras que ofrecía pruebas de detección del VIH en el África Subsahariana diagnosticó erróneamente a 44 personas en la República Democrática del Congo, Burundi y Etiopía con el VIH (Shanks et al., 2015).

También se han encontrado casos aislados donde las coinfecciones y las enfermedades autoinmunes pueden dar lugar a resultados de pruebas de diagnóstico del VIH con falsa reacción, como un paciente con esquistosomiasis asintomática que dio lugar a un falso positivo por VIH (Ochola et al., 2021).

Como han mostrado otros autores, el diagnóstico erróneo del VIH puede dar lugar a graves consecuencias para la salud pública y para las personas, no solo en los países de bajos ingresos (LIC), sino también en los de altos ingresos (Kosack, Page, et al., 2017; Kosack, Shanks, et al., 2017; Lasry et al., 2019). Estos errores de diagnóstico pueden disminuir la validez de las técnicas de diagnóstico del VIH, los programas y las estrategias enfocadas a la prevención y tratamiento de las personas que viven con VIH, así como el aumento del coste en pacientes que no necesitan TAR. La OMS recomienda volver a realizar la prueba de VIH a cada paciente para verificar el diagnóstico antes de iniciar un tratamiento antirretroviral de por vida (Eaton et al., 2017; Lasry et al., 2019) para evitar errores humanos como el etiquetado incorrecto de los resultados de las pruebas y como parte de un programa integral de garantía de calidad para los servicios de pruebas del VIH. Por lo tanto, en los países de renta baja existe una necesidad imperiosa de mejorar el diagnóstico correcto. Además, los efectos de un error en las pruebas del VIH, la clasificación errónea y el tratamiento de las personas VIH negativas tiene importantes consecuencias para el sistema sanitario, principalmente en estos países. Los diagnósticos erróneos en algunos centros de pruebas del VIH en África subsahariana, y los hallazgos inconsistentes sobre la exactitud de las pruebas diagnósticas simples ampliamente utilizadas, han puesto de manifiesto la necesidad urgente de una evaluación exhaustiva de estas pruebas y del algoritmo aplicado, con especial énfasis en su rendimiento según la ubicación geográfica y otras características. Por otro lado, los países y las administraciones deberían evitar diagnósticos erróneos y tratamientos innecesarios también para evitar el trauma psicológico y la estigmatización asociados a la infección por el VIH y la pérdida de credibilidad del programa de pruebas del VIH (Kufa et al., 2017).

El análisis de los **DBS** no puede dar un resultado inmediato, pero puede realizarse con tecnología de laboratorio centralizada, tanto el análisis serológico como

el molecular pueden implementarse sucesivamente en diferentes pasos para el diagnóstico y la tipificación del VIH; incluso pueden medirse los niveles de fármacos para evaluar la adherencia del paciente. Varios autores han informado de una adecuada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico del VIH mediante el análisis de DBS (de Mulder & Holguín, 2013; Fernández McPhee et al., 2015; Rubio-Garrido et al., 2019; Stefic et al., 2020; Tuillon et al., 2020), pudiéndose diagnosticarse de forma fiable tanto las infecciones crónicas como las agudas (Dupwa et al., 2019). Nuestros datos muestran una alta sensibilidad y especificidad para ambos ensayos quimioluminiscentes utilizados con muestras DBS (*Elecsys* y *VIDAS*), similar a la reportada recientemente (**98,8%**) por el estudio de Stefic et al (Stefic et al., 2020).

En relación con los resultados serológicos del estudio y el **test de confirmación del VIH-1/2 de Geenius** ésta puede ser una herramienta fiable para evitar diagnósticos erróneos (Tagny et al., 2020). Ofreció una excelente especificidad (100%) para el diagnóstico del VIH trabajando con muestras de DBS. Sin embargo, la sensibilidad del ensayo *Geenius* en DBS fue del **91,7%** en esta serie, ya que hasta 9 muestras de verdaderos positivos VIH-1 mostraron un resultado negativo por *Geenius*. Otros autores han informado de que presenta una mayor sensibilidad y un mejor rendimiento en la detección de infecciones por VIH-1 que otros inmunoensayos confirmatorios (Hallen et al., 2014; Mor et al., 2014; Serhir et al., 2019). En nuestra serie de muestras, no se detectó ninguna infección por VIH-2 entre nuestros participantes. No hemos encontrado estudios en SSA que hayan detectado VIH-2, otros estudios han descrito infecciones por VIH-2 principalmente en países de África Occidental (Visseaux et al., 2016)

Al evaluar el **diagnóstico en DBS de otras infecciones** en nuestra cohorte de pacientes, observamos una prevalencia de infección por VHA del 84,1%, y concretamente un 46% de los pacientes estaban infectados por **VHA** y VIH-1, pero no pudimos diferenciar si era una infección activa ya que evaluamos los anticuerpos totales. En los países en vías de desarrollo hay una alta prevalencia de infección por VHA debido al agua contaminada, falta de higiene y saneamiento de estos países como RDC. En un estudio realizado por *Mandanda et al.*, obtuvieron una prevalencia del 16,7% aunque en muestras de suero de pacientes con ictericia febril (Makiala-Mandanda et al., 2017). No hemos encontrado estudios realizados de VHA en RDC a partir de muestras de DBS por lo que podemos decir que es la primera vez que se investiga e informa de estos datos de RDC. Respecto a los análisis de **VHB** obtuvimos que el 10,9% de los pacientes habían tenido contacto con VHB en algún momento de su vida y un 4,5% tenía una

infección activa además de la infección por VIH-1. La OMS tiene como objetivo eliminar la hepatitis B y C para 2030 como un problema de salud pública (World Health Organization, 2017b). Sin embargo, a pesar de la alta prevalencia mundial del VHB y de los avances en el tratamiento, la mayoría de las personas infectadas por VHB desconocen su estado y por tanto es muy común diagnosticar la enfermedad en un estado avanzado (World Health Organization, 2017b). La región africana se corresponde con la región de menor proporción de personas diagnosticadas, 0,3% (World Health Organization, 2018). La razón de esta baja proporción se debe a la baja frecuencia de pruebas diagnósticas realizadas a causa de la limitación de recursos para la realización de las pruebas. Es por esto por lo que la OMS publicó unas guías sobre la realización de pruebas diagnósticas del VHB con el fin de fortalecer y propagar esta práctica (World Health Organization, 2017b). Los datos de la prevalencia del VHB en la RDC varían según los diferentes estudios publicados; se observaron diferentes rangos de prevalencias, de 0 a 3,4%, de 3,6 a 6% y superiores al 8%, pero la mayor parte de los estudios obtuvieron prevalencias de entre 3,6 y 6% (Shindano et al., 2018). Respecto a la infección por **VHC** encontramos una prevalencia mayor de pacientes infectados por VHC y VIH-1 en nuestra población, un 10,2%. Entre los ensayos serológicos realizados en este estudio, se observó una variación en el ensayo *Vidas® Anti-HCV*, mientras que *Elecsys Anti-HCV* resultó ser un método fiable para detectar anticuerpos del VHC utilizando las muestras de sangre seca recogidas en el ASS, con una sensibilidad y especificidad del 100%. *Vidas® Anti-HCV* careció de sensibilidad (61,5%) y especificidad (89,4%) en la población congoleña. El valor predictivo positivo es extremadamente bajo (44,4%), por lo que un resultado positivo reportado por este ensayo no confirma la infección por VHC y debe ser verificado por duplicado. Se encontraron muchos resultados falsos positivos (10 de los 18 resultados positivos) al igual que se describe en una revisión reciente en ASS (Candotti et al., 2020). En estudios anteriores realizados en la población de Uganda también se ha informado de los resultados erróneos de las pruebas serológicas del VHC (Mullis et al., 2013; Seremba et al., 2010) La mayoría de los inmunoensayos enzimáticos del VHC se prueban en personas de países económicamente desarrollados, como Estados Unidos y Europa, donde el genotipo 1 es la variante más común pudiendo tener un impacto de la diversidad de genotipos en la sensibilidad de los ensayos serológicos, como han descrito recientemente Davis et al (Davis et al., 2019). Por otro lado, detectamos una prevalencia de infección por **HTLV** y *Treponema pallidum* muy baja ya que solo se

detectaron anticuerpos en el 1,6% de los pacientes analizados para HTLV y ningún paciente tuvo anticuerpos frente *Treponema pallidum*. Tres pacientes tenían una coinfección de HTLV y VIH-1 en el momento del estudio. Algunos estudios sugieren que determinados fármacos utilizados para tratar la infección por VIH-1, como abacavir, pueden ser útiles para el HTLV (Tada et al., 2015). Sin embargo, en este estudio no se han obtenido resultados significativos, por lo que se requiere de una investigación más en profundidad. Además, sería necesario realizar una segunda prueba de confirmación como *INNO-LIA*, un inmunoensayo de línea para la confirmación y discriminación de anticuerpos contra el virus linfotrópico de células T tipo I y tipo II en suero y plasma humanos (Eusebio-Ponce et al., 2019).

El principal punto fuerte de nuestro estudio es mostrar la utilidad de las pruebas de DBS para confirmar o descartar la infección por el VIH en países de bajos ingresos. Evaluar el diagnóstico erróneo del VIH en el ASS es una prioridad de salud pública, ya que el diagnóstico incorrecto conduce a un tratamiento innecesario y difunde actitudes discriminatorias y estigmatización en estas regiones. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación pueden tener un impacto clínico directo en el diagnóstico y seguimiento global de la infección por VIH, ya que el uso de algoritmos de diagnóstico del VIH basados en PDR con una fiabilidad subóptima, en zonas con recursos muy limitados, puede retrasar aún más la consecución de los objetivos 95-95-95 propuestos para 2030.

5.2 Cuantificación molecular a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa

La monitorización de la respuesta al tratamiento frente a la infección VIH es variable. Previa a la aparición del tratamiento antirretroviral de gran actividad, la respuesta terapéutica se basaba en las enfermedades indicadoras de SIDA presentes en el paciente; a día de hoy, prácticamente todos los ensayos clínicos con antirretrovirales utilizan el recuento de linfocitos CD4 y los niveles de viremia en sangre de ARN VIH como medida de respuesta terapéutica (Arribas Rosa Polo & Martínez Juan González García, 2020). Actualmente, la herramienta de laboratorio recomendada para la monitorización del tratamiento antirretroviral es la carga viral; se consigue así definir la resistencia en términos clínicos facilitando la elección de la pauta terapéutica además de tomar decisiones respecto a cambios en dicha pauta ya que es el mejor marcador de respuesta al TAR. Las directrices consolidadas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2016 recomiendan el seguimiento exhaustivo de la carga viral para los pacientes bajo tratamiento (World Health Organization, 2016a).

Considerando los niveles plasmáticos de ARN como medida de respuesta al tratamiento antirretroviral, podemos definir la variable en tres niveles: 1) porcentaje de pacientes que alcanzan unos niveles de ARN en un tiempo determinado inferiores al límite de cuantificación de la técnica, 2) reducción de los niveles de ARN desde el momento basal en el que se comienza un nuevo tratamiento hasta un tiempo de seguimiento determinado (Cabrera et al., 2014), 3) tiempo en llegar a fracaso virológico, definido como niveles de carga viral detectables pasadas 24 semanas desde el comienzo del TAR, o si tras alcanzar la indetectabilidad ésta vuelve a ser >50 copias/mL en dos determinaciones consecutivas separadas entre 2 y 4 semanas (Aguilera Guirao A et al., 2014).

En nuestro trabajo obtuvimos los niveles de carga viral de todos los pacientes y se analizaron en función de la fecha de inicio del TAR, en el caso de los pacientes bajo TAR. En los pacientes naïve, solo se evaluó dicho nivel de carga viral ya que no tenían tratamiento. Esta medida es útil para obtener información acerca del éxito o fracaso terapéutico, definido como respuesta inadecuada al tratamiento antirretroviral, independientemente de si es clínica, inmunológica o virológica; aunque según estudios destacan los recuentos bajos de CD4 y la mala adherencia al TAR como factores más

frecuentes asociados con el fracaso del TAR (Lailulo et al., 2020). Se sospechará un fracaso terapéutico si, tras alcanzar la supresión viral la CV vuelve a ser detectable o, si una vez iniciado el TAR, se dan dos determinaciones consecutivas detectables en un plazo de 2-4 semanas. En caso de que el paciente tenga un virus con mutaciones de resistencia, el fracaso terapéutico se consideraría virológico, definido por una supresión viral incompleta, repunte persistente de la CV o detección de CV después de haber conseguido una CV indetectable (Arribas Rosa Polo & Martínez Juan González García, 2020).

Comparamos **2 métodos de elución para la determinación de la carga viral**; paralelamente fueron analizadas 49 muestras DBS de nuestra cohorte de pacientes ya que solamente 49 fueron analizadas mediante el método de elución de *buffer de lysis* de *EasyMag*. Entre estas 49 muestras, mediante *Roche-CV-Spex* se detectaron el 95,9% de las muestras vs el 65.3% de las muestras detectadas mediante *Roche-CV-Buffer Lysis*. Sin embargo, mediante *Roche-CV-SPEX* se detectaron un 22,4% de muestras más con carga viral detectable. Esto sugiere que la elución mediante *SPEX* favorece considerablemente la detección de ARN viral en comparación con el *buffer de lysis* de *EasyMag* reduciendo el tiempo de incubación considerablemente de 2 horas a 10 minutos mejorando la detección de la carga viral de VIH y de esta manera mejorar la monitorización viral. Aunque el bajo volumen de sangre recogido en los DBS puede limitar la sensibilidad de la cuantificación de la carga viral en comparación con el plasma, los DBS han sido recomendados ampliamente por la OMS para la toma y monitorización del VIH (de Mulder & Holguín, 2013). Este método de elución nos ha permitido realizar la cuantificación de la carga viral de nuestras muestras DBS.

Además, se llevó a cabo un estudio de **comparación entre 2 técnicas de cuantificación viral**. La cuantificación de la carga viral de nuestra población mediante *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)* y *Xpert HIV-1 VL (Cepheid)* fue adecuada por ambas técnicas. El porcentaje de detección de ambas técnicas variaba debido a la diferencia de muestras analizadas ya que mediante Xpert solo pudimos analizar 116 muestras mientras que por Roche-CV pudimos analizar el total de las muestras (n=362); Xpert-CV (n=116) pudo detectar el 89.6% y Roche-CV el 63.8% (n=362). Obtuvimos buenos resultados con ambas técnicas pero se decidió continuar con la técnica de Roche-CV debido a la mayor capacidad de procesamiento de muestras a la vez, mayor capacidad de detección de CV (ya que se sitúa en 20

cp/mL), debido a que el precio de determinación por paciente en comparación con Xpert-CV era más económico permitiendo en un posible futuro la integración de este equipo en los hospitales para la monitorización de la carga viral; pero sobre todo para evaluar la capacidad de esta técnica de detectar y cuantificar variantes complejas en el gen *pol*. Según la información del fabricante, el ensayo, *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® VIH-1 Test, 2.0* era capaz de cuantificar subtipos del grupo O y de los subtipos A-H del grupo M del VIH (U.S. Food and Drug Administration (FDA)., 2007; World Health Organization, 2012). Sin embargo, no ha sido evaluado en un gran panel de variantes URF.

Al comparar 116 muestras paralelamente con ambas técnicas, Roche-CV detectó 4 muestras por debajo del límite de detección de Xpert-CV (<40 cp/ml), que esta técnica no pudo detectar. Los resultados de CV, dentro del rango de cuantificación de ambas técnicas, estuvieron disponibles para 105 pacientes con VIH-1 y aunque se observó una correlación elevada en la cuantificación de CV entre ambas técnicas, los valores de Ct observados fueron dependientes del ensayo de CV y diferentes en los 105 DBS detectados por ambas técnicas de CV. Esto indica que lo más adecuado para la monitorización de la CV de las personas que viven con VIH es utilizar siempre el mismo método de cuantificación de CV evitando sobreestimaciones asociadas al ensayo realizado, pudiendo provocar una interpretación errónea de los datos obtenidos. Además de evitar cambios innecesarios en las pautas terapéuticas favoreciendo una buena adherencia y la detección de mutaciones de resistencia frente al TAR anticipando el posible fracaso terapéutico. En nuestro estudio, el 40,3% de los pacientes se encontraban por encima de las 1.000 cp/mL, el límite de carga viral definido por la OMS para confirmar fallo virológico en países de bajos y medios ingresos y cuando se utiliza DBS en adultos (World Health Organization, 2014). No obstante, solo 88 pacientes (35,2%) tenían experiencia de TAR de los cuáles el 88,6% sospechamos que se encontraban en fracaso terapéutico debido al nivel de su CV posiblemente debido a la falta de adherencia al TAR y/o del desarrollo de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales siendo necesario en este grupo el apoyo a la adherencia al TAR o la monitorización del tratamiento para evitar que las mutaciones de resistencia provoquen un fracaso terapéutico (World Health Organization, 2017a)

Varios ensayos clínicos han demostrado que el inicio rápido del TAR, el día del diagnóstico o en la primera semana, promueve la retención de los pacientes en la

atención y aumenta la proporción de pacientes con supresión virológica (Ford et al., 2018; Pérez Molina et al., 2019). Sin embargo, el acceso a las pruebas de carga viral en África Subsahariana es muy variable y los análisis recientes demuestran que, en muchos entornos, menos de la mitad de las personas que reciben tratamiento antirretroviral se someten a una prueba de carga viral rutinaria según las directrices nacionales o de la OMS (Ross et al., 2020). Sumado a la evolución continua del VIH, se dificulta el diagnóstico y complica la práctica clínica (de Oliveira et al., 2018), por lo que es un desafío para el diagnóstico molecular y los ensayos de CV detectar y/o cuantificar correctamente diferentes variantes del VIH-1. Los resultados obtenidos mediante este ensayo cuantitativo nos indican que **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® VIH-1 Test, 2.0** puede detectar y cuantificar con éxito recombinantes complejas en *pol* en muestras DBS. Actualmente, en el centro hospitalario Monkole se ha implantado esta técnica de carga viral para la monitorización de las personas que viven con VIH y poder mejorar el seguimiento del TAR, así como la decisión del comienzo del mismo y cambios en la pauta terapéutica de los pacientes que ya están bajo tratamiento.

5.3 Caracterización molecular de VIH-1 y estudio de mutaciones de resistencia a partir de sangre seca (DBS) en pacientes de Kinshasa

La diversidad genética de VIH presente en esta región de África Subsahariana es superior a la cualquier otra región, pero sobre todo del grupo M, en esta región es muy interesante ya que dentro del país la distribución geográfica es muy heterogénea e incluso varias cepas co-circulan en varias regiones al mismo tiempo favoreciendo la coinfección entre ellas (Ntambwe Erick et al., 2013). Varios estudios demuestran que la República Democrática del Congo alberga el mayor número de subtipos co-circulantes, incluyendo la diversidad intra-subtipos, CRFs complejos, formas recombinantes únicas (URF), y cepas no clasificables (Rodgers et al., 2017; Vidal et al., 2000). En este trabajo se presenta información de las secuencias de *pol* de 111 sujetos, obtenidas en población adulta, que representan los datos más recientes sobre los subtipos circulantes de VIH-1 y las formas recombinantes en población adulta en Kinshasa en el periodo 2016-2019.

Estudios previos realizados en esta región sugieren que el subtipo A es el predominante seguido del D, C y G, destacando la presencia de las formas recombinantes circulantes (CRFs) y las formas recombinantes únicas (URFs) (Djoko et al., 2011). Sin embargo, a lo largo del tiempo la proporción de subtipos puros A, D, G y H ha ido decreciendo al mismo tiempo que la proporción de formas recombinantes como CRFs y URFs han ido aumentando y un incremento del subtipo puro C (Hemelaar et al., 2019). La distribución de las cepas circulantes está en un constante movimiento de evolución y el hecho de que la prevalencia de los subtipos varíe con los años está favorecida por factores como el TAR, la propia adaptación del virus y/o la presión selectiva del sistema inmune (Kamangu et al., 2017). Es más, en África central entre 2010-15, se observó la mayor proporción de URFs de entre todas las regiones, un 21,3%, dando lugar a una tasa de recombinantes del 46,8%.

En nuestro estudio se encontró que el subtipo más prevalente fue el **subtipo puro A** que estuvo presente en el 25,2% de los pacientes, aunque hay que destacar que un alto porcentaje de las secuencias analizadas, el 33,3%, globalmente, fueron cepas recombinantes (URFs y CRFs): 18% formas recombinantes circulantes (CRFs) y 15,3% formas recombinantes únicas (URFs). Entre los recombinantes hallados en nuestro estudio encontramos una alta prevalencia del **CRF45_cpx**, fue el más prevalente en un 20% de los sujetos infectados con esta variante; y entre los pacientes

infectados con URFs, el 41,2% presentaba el **URF_AU** como variante infectante. En otros estudios realizados en esta zona de África Subsahariana se ha observado la presencia de muchas formas recombinantes debido a la alta diversidad, algunos de los CRFs son CRF01_AE y CRF02_AG. En nuestra población de estudio hemos encontrado estas variantes, pero en menor medida que las que acabamos de comentar. Eso indica que a lo largo del tiempo la presencia de una prevalencia alta de cepas recombinantes indica que la selección de variantes recombinantes nuevas es más fácil gracias a la alta variabilidad, pero la evolución viral sería posiblemente más rápida en las regiones con una diversidad más baja (Hemelaar et al., 2019).

Como se ha comentado anteriormente los subtipos D, G y C han sido los subtipos más prevalentes en Kinshasa, RDC, después del subtipo A. Hemos observado en nuestra población de estudio un cambio en la prevalencia de estos subtipos ya que la prevalencia de los recombinantes va en aumento cada año al mismo tiempo que los subtipos puros C, G y D disminuyen. Hemos obtenido una prevalencia del 9% en nuestras muestras para los subtipos G y C, pero obtuvimos una prevalencia inferior para el subtipo D del 4,2%. En nuestra población de estudio hemos observado un descenso de la prevalencia del subtipo C en comparación con los datos obtenidos entre 2010-2015 por *Hemelaar* y colaboradores (Hemelaar et al., 2019) que podría deberse al incremento de los recombinantes.

Sin embargo, el uso de secuencias genómicas parciales y cortas y no los genomas completos podría subestimar las tasas de recombinación obtenidas en nuestro estudio al igual que en aquellas previamente informadas en el país. Por lo tanto, la tasa de recombinantes en RDC podría ser aún mayor si se evalúan más regiones virales como el gen *env*. En nuestro estudio las variantes obtenidas mediante las herramientas online de subtipaje de **Stanford** y **Geno2pheno** discreparon significativamente respecto al análisis filogenético. Esta técnica es el *gold standard* para el subtipaje de VIH-1 mediante genomas completos, las herramientas automáticas online como *Stanford* y *Geno2pheno* están basadas en la similitud de secuencias y pueden tener más complicaciones a la hora de clasificar subtipos no-B o CRFs (Yebra et al., 2011). Esto corrobora que únicamente el 39,1% y 24,3% de las secuencias, respectivamente, coincidieron con los resultados de la filogenia. Aunque para estudios clínicos y de vigilancia estas herramientas son útiles para el subtipaje. Normalmente el estudio de las resistencias y el subtipaje se analizan conjuntamente, *Stanford* y *Geno2pheno* proveen

esta información, pero es mejor complementarlo con otras técnicas como, por ejemplo, el **análisis filogenético** (Pineda-Peña et al., 2013).

Observamos una tendencia de cambio en la diversidad genética de la zona, confirmamos que el subtipo A es el más prevalente actualmente, al igual desde que se declaró la epidemia en 1983 (Kamangu et al., 2017) pero las formas recombinantes aumentan progresivamente cada año. Esta alta variabilidad genética tiene un riesgo potencial para la terapia antirretroviral de los pacientes VIH+ debido a la presencia de diferentes mutaciones de resistencia, ya que los ARVs han sido desarrollados utilizando el subtipo B como modelo. Además, las diferencias entre subtipos siguen desempeñando un papel importante en el desarrollo de mutaciones de resistencia a los medicamentos (Lessells et al., 2012; Meriki et al., 2019).

Digno de mención respecto a la diversidad genética en Kinshasa, fue encontrar 6 (5.4%) secuencias sin referencia de clasificación de subtipo, fueron clasificadas como U, únicas, por no poder ser clasificadas. Estos datos quedan reforzados gracias al estudio realizado por Djoko y colaboradores en 2011 haciendo referencia a que en torno al 5% de las cepas circulantes no pudieron ser clasificadas en los subtipos o CRFs ya descritos (Djoko et al., 2011). Por otro lado, un 16.6% de las muestras DBS, pertenecían a pacientes VIH negativos y no fueron analizadas para el estudio de genotipado y resistencias. Sin embargo, en el 52,7% de las muestras de DBS no se pudo amplificar *pol*, por lo que no se pudo obtener ninguna secuencia viral de estos pacientes. El 86% de los pacientes tenían baja carga viral (40-1.000 copias de ARN del VIH-1/*dot* del DBS) y eso limita la capacidad de obtener amplificaciones positivas de PCR del VIH en estas muestras. Sin embargo, el 13,6% tenían alta carga viral pero no pudimos obtener su secuencia, probablemente debido a alguna contaminación en la preparación de los primers, un fallo en la cadena de frío pudo alterar la estabilidad del RNA; pero creemos que, debido a la alta variabilidad genética del virus, esta hubiera provocado mutaciones en las regiones virales de unión a los cebadores empleados en las PCR realizadas. Nada improbable si tenemos en cuenta alta frecuencia de recombinantes únicos con estructura genética compleja encontrados en este país y en concreto en Kinshasa. Por lo que no descartamos que los *primers* diseñados por la OMS con características de universalidad para las amplificaciones realizadas en nuestro estudio, pudieran tener limitaciones a la hora de amplificar nuevas variantes que actualmente circulan en RDC. Ello refuerza la importancia de este estudio y la necesidad de seguir realizando estudios

de genotipado para discernir y conocer dichas nuevas variantes infectantes, ya que la diversidad presente en esta región es extremadamente alta, y en estos entornos como Kinshasa, la selección de variantes recombinantes es más sencilla y una evolución viral más rápida por la co-circulación de múltiples variantes (Hemelaar et al., 2019; Kamangu, 2018). Unido a esto, el hecho de que a medida que podamos discernir e identificar las cepas recombinantes, así como aplicar las correctas medidas mejorará la calidad de vida de las personas que viven con VIH en esta región, pero nos ayudará a poder avanzar en la lucha por el fin de la pandemia. Pero la mayoría de las cepas circulantes albergan una compleja estructura genómica, muchas de las cuales desarrollan resistencias frente a los fármacos del TAR.

En nuestra población de estudio, analizamos a los pacientes en función de si tenían experiencia con el TAR, naïve y pacientes sin datos de su TAR. No observamos una variación significativa en el genotipado ya que entre los pacientes bajo TAR y los pacientes naïve ya que presentaban como subtipo predominante el subtipo puro A seguido de los CRFs y los URFs. En cambio, en los pacientes de los cuáles desconocíamos los datos de su TAR, obtuvimos que un 28.6% de los pacientes estaban infectados por URFs, entre los que el 50% presentaban la variante infectante URF_AU. Entre los demás pacientes observamos diversas variantes entre las que encontramos el subtipo puro A, G o un CRF en un 14,3%, cada uno. En otro estudio en el que se evaluaron pruebas *point of care* (POC) para el diagnóstico temprano infantil y carga viral a partir de recombinantes complejos del VIH-1 en niños obtenidas en DBS que fueron enviadas a laboratorios de España, se demostró la capacidad de detección de variantes circulantes del VIH-1 mediante estas pruebas en muestras DBS (Rubio-Garrido et al., 2019). Son necesarios más estudios e investigación acerca de las variantes circulantes del VIH-1, así como el desarrollo de resistencias a los antirretrovirales ya que la información es limitada en las diferentes zonas del país.

Por otro lado, la alta diversidad ha potenciado la aparición de mutaciones de resistencia a los diferentes regímenes de TAR de pacientes con experiencia en TAR y también en pacientes naïve (Arimide et al., 2018). Una medida complementaria a la monitorización de la carga viral es la monitorización de las mutaciones de resistencia a los antirretrovirales; es una medida vital para minimizar la selección de mutaciones de resistencia a los medicamentos del VIH. Dicha medida requiere interpretar correctamente los ensayos de resistencia realizados y debemos conocer, en el caso de

los ensayos genotípicos, la correlación existente entre un determinado patrón de mutaciones o un determinado *fold change* con la respuesta virológica (ensayo fenotípico). Es decir, emplear algoritmos de interpretación o reglas basadas en la eficacia virológica, en el caso de ensayos genotípicos, y puntos de corte clínicos en los ensayos fenotípicos.

Los estudios previos realizados y publicados de RDC aportaban datos de resistencias en adultos, no tratados (Djoko et al., 2011; Kamangu et al., 2015; Kwon et al., 2020; Muwonga et al., 2011; Vidal et al., 2006) y tratados (Boillot et al., 2016; Bossard et al., 2021; Muwonga et al., 2011) a partir de muestras obtenidas desde 2002 hasta 2014. Sin embargo, nuestro estudio ha analizado muestras procedentes de pacientes adultos desde 2016 hasta 2019, actualizando los datos acerca de las mutaciones de resistencia en esta zona del país en la población adulta. El perfil de resistencias basales puede haberse modificado en los últimos años significativamente debido a la ausencia de monitorización virológica y el tratamiento de un mayor número de pacientes. Además, un estudio publicado en colaboración con otros investigadores (Rubio-Garrido et al., 2021) ha aportado los primeros datos acerca de las mutaciones de resistencia frente a los inhibidores de integrasa (INI) antes de la implementación del dolutegravir (DTG) en la pauta terapéutica de primera línea en niños y adolescentes. En el presente trabajo, aportamos datos acerca de las mutaciones de resistencia de integrasa frente a todos los INIs en adultos.

En concreto, en Kinshasa, únicamente siete estudios han evaluado la prevalencia de resistencia a antirretrovirales. En primer lugar, un estudio que utilizó muestras recogidas en 2007 evaluó en un grupo de 94 militares VIH+ las variantes genéticas del VIH y la presencia de mutaciones de resistencia a antirretrovirales. Se trataba de militares con distintos orígenes y entre los cuales la mayoría habían pasado algún tiempo fuera de Kinshasa. No se encontró ninguna mutación de resistencia a ITIANs o ITINANs y sólo en un caso, una mutación de resistencia a un IP (Djoko et al., 2011). En otro estudio transversal realizado en 2008, **Muwonga y colaboradores** encontraron en muestras de 289 personas VIH+ atendidas en 3 centros médicos de Kinshasa, que 26 (9%) presentaban mutaciones de resistencia a al menos un fármaco del régimen antirretroviral prescrito: 2/26 con mutaciones de resistencia a un fármaco del régimen, 14/26 con resistencia a dos fármacos y 10/26 a los tres fármacos del régimen. La proporción de pacientes con resistencia a sus tratamientos fue del 4% en

pacientes en tratamiento antirretroviral durante 12-23 meses, 14% para 24-35 meses y 9% para personas en tratamiento durante más de 35 meses (Muwonga et al., 2011).

Nuestro estudio reveló que entre las 230 secuencias analizadas entre RT/PR/INT, obtuvimos una prevalencia de **resistencia del 18.3%** entre todas las secuencias obtenidas de proteasa (PR), retrotranscriptasa (RT) e integrasa (INT) de los pacientes VIH-1 procedentes de Kinshasa. Entre estas secuencias, el 59.5% pertenecían a sujetos que se encontraban o habían tenido experiencia previa con el tratamiento antirretroviral; el 23.8% a sujetos de los cuáles desconocíamos si estaban bajo TAR y un 16.7% a pacientes naïve. Encontramos una alta prevalencia de mutaciones de **resistencia a los fármacos ITINANs y ITIANs, 37,6%**, pero la baja prevalencia de mutaciones de resistencia contra los inhibidores de la proteasa e integrasa refleja el bajo uso de estos fármacos en el momento del estudio además del poco acceso a esta clase de fármacos en esta región, así como la alta barrera genética de este tipo de ARVs.

Si nos fijamos en las mutaciones de resistencia a la transcriptasa inversa, la prevalencia de mutaciones de **resistencias a ITIANs y ITINANs fue del 15.3% y 36.5%, respectivamente**. Sin embargo, el **59.6% tenía mutaciones de resistencia solamente a ITINANs**. Estos datos nos confirman una alta prevalencia de resistencia en RT en Kinshasa, perteneciente sobre todo a pacientes bajo TAR, pero cabe destacar un gran porcentaje en pacientes no tratados. En 2017 la OMS recomendó el uso de un régimen alternativo de primera línea que no contuviera ITINANs como EFV o NVP en aquellos países en los que la resistencia a estos fármacos superase el 10% (World Health Organization, 2017c). Los ARV no análogos de RT, EFV y NVP se caracterizan por una baja barrera genética y rápido desarrollo de resistencias (Wang et al., 2014) provocando que el tratamiento de primera línea falle impidiendo la correcta supresión de la infección y por tanto una posible diseminación. Al no haber una monitorización de resistencias accesible y de calidad, los pacientes no pueden saber si su tratamiento funciona y, por tanto, favorece el desarrollo de resistencias que acaban por provocar el fallo terapéutico.

La mutación **K103N** fue la más frecuente en nuestra población de estudio frente a los ITINANs, presente en 19 patrones de mutaciones principales y responsable de las mutaciones de resistencia cruzada en esta clase de fármacos; principalmente en los pacientes bajo TAR (66.7%). Una mutación muy común en los tratamientos que incluyen EFV y NVP, aunque también se ha encontrado en 1 paciente que no había recibido

tratamiento alguno y en pacientes con TAR desconocido. Además, hemos observado la presencia de otra mutación con segunda mayor prevalencia, **V108I**, en un 12.9% de las secuencias con mutaciones frente ITINANs, principalmente en los pacientes con experiencia previa en TAR, un 9,5%; también muy común en los pacientes que reciben TAR que incluye NVP, EFV y ETR (<https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes>).

La prevalencia de resistencia frente a ITIANs fue inferior a la de ITINANs, todas las mutaciones de resistencias frente a ITIANs estaban en combinación con las mutaciones frente a los no análogos excepto 1 muestra. La mutación más frecuente frente a ITIANs fue **M184V**, en el 27% de las secuencias, seguida de V75M, K70R y D67N en el 11,5%, respectivamente. M184V es seleccionada por 3TC y FTC, es una mutación muy común en pacientes infectados por VIH (Meriki et al., 2019), apareció en 7 patrones mutacionales principales en este estudio, con un alto nivel de resistencia a la lamivudina y la emtricitabina. La cepa que porta esta mutación tiene un alto nivel de resistencia a 3TC y FTC, como hemos confirmado en nuestros resultados, ya que todas las secuencias con esta mutación presentaban niveles altos de resistencia a ambos fármacos. Pero se ha demostrado que tiene efectos favorables sobre la susceptibilidad de algunos otros ITIANs como ABC y ddl (Eron et al., 2007) y puede retrasar la progresión clínica e inmunológica al disminuir la aptitud viral. Aunque siempre es mejor no tener resistencia es importante aprovechar los efectos beneficiosos de la mutación M184V cuando está presente (Gallant, 2006; Stirrup et al., 2020). A pesar de la posible resistencia la lamivudina (3TC) sigue siendo esencial en estas regiones para las recientes estrategias de tratamiento innovadoras debido a su eficacia, seguridad, la disponibilidad de versiones genéricas de bajo coste y combinación con otros fármacos (Quercia et al., 2018) ya que como hemos comentado la disponibilidad en esta región y en África Subsahariana es muy arbitraria.

Las mutaciones **V75M**, **K70R** y **D67N** las cuáles están asociadas a presentar resistencia a d4T, TDF y AZT respectivamente. V75M, se selecciona en pacientes que reciben un régimen que contiene d4T (nivel intermedio) y 3TC y baja resistencia a ddl; particularmente en los virus CRF01_AE (Tang et al., 2013), sin embargo, en nuestros resultados resultó aparecer en pacientes infectados con los subtipos A y H. En cambio, D67N y K70R y pertenecen al grupo de mutaciones análogas de timidina (TAMs); D67N, reduce la susceptibilidad principalmente al AZT y al d4T, pero en presencia de otras

TAMs se asocia con una menor susceptibilidad al ABC, ddI y TDF. K70R confiere una resistencia de nivel intermedio al AZT y una resistencia de nivel bajo al d4T y al TDF (Kamangu et al., 2015). En nuestros resultados observamos variabilidad en estos niveles de resistencia frente a los fármacos donde vimos niveles intermedios y altos de resistencia frente a TDF, AZT y d4T posiblemente debido a la presencia de otras mutaciones de resistencia frente a ITIANs.

Nuestros hallazgos aportan información acerca de la situación en esta región del país, otro de los estudios realizados sobre las mutaciones de resistencias por **Eun Hee Kwon y colaboradores en 2020**, evaluaron en otras zonas de RDC las mutaciones frente a ITIANs e ITINANs en trabajadoras sexuales. M184V/I y K103N también fueron las mutaciones mas prevalentes al igual que en nuestro estudio. Al parecer, la prevalencia obtenida en nuestro estudio es significativamente más alta que las descritas anteriormente frente a ITIANs e ITINANs en Kinshasa, en estudios previos de África Central y la RDC señalan que entre el 7 y el 11% de las cepas del VIH-1 son resistentes a los ITINANs (Gupta et al., 2018; Muwonga et al., 2011) y en Kinshasa se ha informado de un 11% de resistencia a los medicamentos transmitidos (Muwonga et al., 2011).

Por otro lado, en las secuencias analizadas de **proteasa** encontramos una prevalencia del 6.5%. Las mutaciones frente a los IPs en estas secuencias fueron M46L, L10F, Q58E, L90M, I47V y I47A en el 20% de las secuencias cada una. El 40% pertenecían a pacientes que se encontraban bajo tratamiento antirretroviral o habían tenido experiencia previa. No destacaba ninguna mutación en concreto, pero entre las mutaciones importantes: **L90M**, reduce la susceptibilidad a cada uno de los IP excepto TPV y DRV pero se mostraron niveles altos de resistencia frente a LPV/r y niveles intermedios frente a SQV/r IDV/r; **M46L**, normalmente aparece sola, pero nuestro caso apareció junto con la mutación I47A y es seleccionada por IDV, NFV, FPV, LPV y ATV; **I47V** e **I47A** ambas se asocian con reducida susceptibilidad a SQV y ATV pero **I47A** confiere altos niveles de resistencia a LPV/r y FPV/r como los niveles obtenidos en la muestra que tiene esta resistencia (<https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes>); y dos mutaciones accesorias, Q58E, L10F. Q58E, es una mutación accesoria, seleccionada por la mayoría de los IP (Rhee et al., 2003) pero solo obtuvimos un bajo nivel de prevalencia frente a TIP/r, en cambio, **L10F** fue encontrada en el único paciente naïve con resistencia a IPs seguramente infectado por una cepa con mutación transmitida debido a que no había tenido ninguna experiencia con ARVs provocando bajos niveles de resistencia frente a FPV/r y NFV/r. Los inhibidores de proteasa se usan

en Kinshasa y RDC de segunda y tercera línea de terapia (World Health Organization, 2021) por lo que las mutaciones halladas pueden ser debido a la exposición a los IPs o por cepas con mutaciones transmitidas ya que al menos 1 de los pacientes no tuvo TAR con IPs a pesar de estar en segunda línea; y otro paciente si que estaba bajo TAR con IPs; de hecho, la barrera genética es alta para esta clase de fármacos que hay mayor dificultad de desarrollar mutaciones de resistencia pero una mutación mayor para el IP puede conducir a una resistencia irreversible para el IP específico provocando un fallo terapéutico y pérdida de ese fármaco. Mientras que se necesita una acumulación de varias mutaciones menores para conducir a una resistencia irreversible para el IP (Kamangu et al., 2015).

Aunque las medidas recomendadas para los fracasos de primera línea basados en ITINANs consisten en cambiar a un régimen optimizado de ITIANs + IP, actualmente la OMS, desde 2019 recomienda el régimen de ITIANs + DTG para los fracasos de primera línea basados en TDF: AZT/3TC/ DTG; para los fracasos de AZT: TDF/3TC/DTG (World Health Organization;, 2019). Otro estudio realizado en pacientes procedentes de RDC y Kenia mostró que un 33% de sus pacientes con regímenes basados en TDF eran resistentes al AZT, y casi la mitad de los que estaban en tratamientos basados en AZT eran resistentes al TDF (Bossard et al., 2021). Por lo que podemos concluir que estas recomendaciones asumen que los pacientes con fallo terapéutico por mutaciones frente a un ITIAN, el resto seguirán siendo susceptibles al otro, pero nuestros resultados acerca de la alta prevalencia de resistencia, así como los resultados obtenidos por Bossard y colaboradores hace que nos planteemos vigilar de manera atenta el cambio de los ITIANs como base de tratamiento.

Los resultados obtenidos de la prevalencia de mutaciones de resistencia frente a los **inhibidores de integrasa** han sido previos a la implementación del DTG en Kinshasa como parte del TAR de primera línea y previamente a la implementación de los INIs. La prevalencia de mutaciones de resistencia fue del 7.6% en las secuencias de integrasa frente a los INIs. Principalmente encontramos el 60% de estas mutaciones en los pacientes naïve. Las mutaciones de resistencia frente a integrasa no son muy abundantes gracias a la alta barrera genética de sus ARVs. Sin embargo, obtuvimos varias mutaciones: **T66S**, **S153SF**, **N155D**, **T97A** y **E157Q** cada una en un paciente distinto. E157Q se produce entre el 2-5% de los virus de pacientes sin tratamiento antirretroviral, dependiendo del subtipo. Tiene un efecto mínimo, si es que tiene alguno,

sobre la susceptibilidad a RAL, EVG o DTG (Anstett et al., 2016; Geretti et al., 2012) y por sí sola no parece influir en la respuesta a la terapia con INIs (Charpentier et al., 2018); desconocemos el TAR de nuestro paciente, nuestra hipótesis es que es probable que no estuviera recibiendo TAR basado en INIs debido a que los regímenes en RDC todavía no disponían de estos ARVs, esto encajaría con las características descritas de esta mutación.; **S153F**, se selecciona in vitro por DTG pero pueden reducir la susceptibilidad al EVG, DTG y BIC (van Wesenbeeck et al., 2011). Según la literatura N155D es una mutación rara que no se ha caracterizado bien; T97A, aparece en pacientes que reciben TAR de RAL, EVG y DTG, aunque puede aparecer entre el 1% y 5% de pacientes no tratados (Abram et al., 2017). Ninguno de nuestros pacientes ha sido tratado con INIs en ningún momento. Esto nos hace plantearnos la posibilidad de haber descrito mutaciones frente a los INIs en pacientes no tratados y tratados con otros regímenes de ARVs por primera vez en Kinshasa. Sin embargo, poco se sabe del impacto de la farmacoresistencia previa al TAR (pacientes naïve) sobre la eficacia de los inhibidores de integrasa de segunda generación; pero según un estudio realizado por *Siedner et al* acerca de los pacientes de ensayo clínico *ADVANCE*, que compara tres regímenes para el tratamiento inicial del VIH en Sudáfrica (DTG + TAF + FTC); (DTG + TDF + FTC); (EFV + TDF + FTC), observaron una fuerte asociación entre la resistencia a los medicamentos antes del inicio del tratamiento, principalmente a la clase de ITINANs, y el fracaso virológico para las personas que inician el TAR de primera línea en este ensayo. No se sabe que las mutaciones de ITINANs afecten la susceptibilidad de DTG, pero se observó que la resistencia a los ITINANs parece predecir en última instancia el fracaso del tratamiento entre las personas que inician el TAR basado en DTG en los países de ingresos bajos y medianos (Siedner et al., 2020).

Los datos que proporcionamos de las mutaciones de resistencia frente a los inhibidores de integrasa son actuales y pocos estudios más han evaluado estas mutaciones en Kinshasa, RDC. No tenemos constancia de que se hayan descrito antes en ningún otro estudio realizado allí, por lo que estamos aportando datos nuevos acerca de la situación epidemiológica de resistencias frente a los INIs. Estos hallazgos acerca de las mutaciones de resistencia indican y corroboran que las pruebas de resistencias deben realizarse antes de iniciar el tratamiento de los pacientes y antes de la decisión de iniciar o cambiar el tratamiento para una mejor atención de los pacientes. Sin embargo, sumado a esto, la monitorización de las resistencias no está disponible de manera rutinaria en el país y los cambios en el régimen de tratamiento vienen determinados en

su mayoría por la disponibilidad de los ARV, restricciones de uso por el desabastecimiento, interacciones con otros medicamentos, toxicidad y efectos secundarios en los pacientes (Gils et al., 2018; PNMLS, 2018).

La OMS recomienda la realización de pruebas de resistencia en la población infectada para monitorizar la prevalencia de virus resistentes en pacientes sin experiencia previa en el tratamiento antirretroviral (naïve) y en los ya tratados (Bennet et al., 2008; World Health Organization, 2017a). Aunque suele haber un suministro regular de TAR en la RDC según los clínicos colaboradores en este trabajo, los tratamientos esporádicos, la exposición interrumpida a los medicamentos y las altas tasas de pérdida de seguimiento pueden provocar la aparición y propagación de mutaciones de resistencia.

Los datos actualizados sobre la resistencia de este estudio pueden ayudar a los médicos a establecer el tratamiento antirretroviral de primera línea para los pacientes naïve, o a orientar la optimización del tratamiento de segunda línea en los pacientes pretratados con fracaso virológico. La RDC carece actualmente de estudios de vigilancia sistemática para controlar la resistencia a los ARV y detectar cambios en la epidemiología molecular del VIH-1. Por lo tanto, es necesario implementar estos métodos en los hospitales y convertirlos en un proceso rutinario antes de iniciar la terapia antirretroviral.

5.4 Adherencia al tratamiento antirretroviral y asociación con el desarrollo de mutaciones de resistencia en Kinshasa

En la RDC, al igual que en otros países del África subsahariana, los diagnósticos moleculares y las pruebas de carga viral están principalmente centralizados en un único laboratorio nacional, poco accesible o restringido a unos pocos hospitales privados específicos. Además, el seguimiento de la resistencia no está disponible de forma rutinaria en el país (PNMLS, 2018) dificultando poder alcanzar los objetivos 95-95-95 de ONUSIDA para 2030. Este estudio proporciona un conocimiento adicional de la diversidad genética presente en Kinshasa y de las cepas circulantes del VIH-1.

Como ya sabemos el acceso de las personas bajo tratamiento antirretroviral a la monitorización es limitado o casi nulo ya que estos países en vías de desarrollo deben superar obstáculos tanto económicos como acceso insuficiente a instalaciones de laboratorio, dificultades para la recolección de plasma, transporte de muestras y

mantenimiento de las muestras biológicas (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), 2014; Rutstein et al., 2016) para poder ampliar la monitorización de la carga viral y conseguir la supresión viral de todas las personas que viven con VIH y bajo TAR para controlar la epidemia mundial. Es un enfoque rentable y sostenible para culminar el tratamiento, lo que visitas de atención médica mínimas para los pacientes con supresión viral (Phillips et al., 2015). Además, permite la detección precoz y precisa del fracaso del tratamiento antes del deterioro inmunológico y las consecuencias posteriores.

Un estudio recogió los datos de 8 países de África Subsahariana acerca del crecimiento de la implementación de la carga viral como medida de control y seguimiento del tratamiento antirretroviral entre 2013 - 2018. El aumento de TAR provocó el aumento de la demanda de pruebas de carga viral. En un principio, únicamente 3 países tenían una tasa de supresión viral mayor o igual del 80% pero a finales de 2018 todos los países excepto uno, Costa de Marfil, tenían una tasa de supresión mayor o igual del 85% (Lecher et al., 2021). La República Democrática del Congo no se incluyó en estos países ya que los datos no estaban disponibles, e incluso actualmente se desconoce la tasa de supresión viral de RDC. Por esta razón nuestros resultados aportan luz acerca del estado de las personas que viven con VIH y están recibiendo TAR, así como nuevos casos diagnosticados, es decir, datos actuales de la situación de pacientes VIH + provenientes de Kinshasa que promueven la urgente necesidad de controlar la epidemia de VIH.

Uno de los análisis que realizamos fue examinar los niveles de carga viral de los pacientes que tenían un perfil de resistencia y observamos que en los pacientes con niveles de carga viral superiores a 4 log cp/ml e inferiores a 5 log cp/ml se encontraron mayores niveles de cepas de tipo salvaje que cepas resistentes. Se observó que el 60,7% eran pacientes en TAR y se asumió que su adherencia al TAR era muy baja o que habían abandonado el TAR al no haber desarrollado mutaciones de resistencia para tener fracaso virológico. Por otro lado, en los pacientes con niveles de viremia entre 3 log cp/ml y 4 log cp/ml y por encima de 5 log, ocurrió lo contrario, se obtuvieron mayores niveles de pacientes con mutaciones de resistencia, 57,8% y 25,7%, respectivamente, correspondían a pacientes en fracaso virológico.

Como hemos comentado, la monitorización de la carga viral nos facilita el seguimiento de los pacientes VIH+, además la escalada global del TAR ha resultado en

un descenso de la morbilidad, mortalidad y transmisión del VIH (Ford et al., 2018). Sin embargo, el acceso al TAR ha provocado un aumento en la aparición de mutaciones de resistencia a los ARVs, sobre todo frente a aquellos con baja barrera genética, y una de las razones es la falta de monitorización de carga viral ya que su expansión no ha ido acompañada con el avance de los programas de implantación del TAR. Esto conduce a una identificación tardía de los pacientes con fracaso terapéutico, con riesgo de acumulación de mutaciones de resistencia a los medicamentos en dichos individuos (World Health Organization, 2016b). Además, los individuos con fracaso del tratamiento virológico no reconocido son reservorios potenciales para la transmisión de virus con mutaciones de resistencia conocidas como resistencias transmitidas (Arimide et al., 2018; Gilks et al., 2006; Hamers et al., 2012; Kityo et al., 2017)

A medida que continúan los esfuerzos y más personas reciben ARV para el tratamiento o la prevención del VIH, es probable que haya un aumento en los niveles de mutaciones de resistencia. A esto hay que añadirle que a pesar de que muchos de los países de África subsahariana utilizaron desde el principio la triple terapia, muchos de ellos como la RDC, presentan graves deficiencias que pueden agravar el desarrollo de la resistencia a los medicamentos. Entre ellas el uso generalizado de regímenes de bajo coste y de baja barrera genética, acceso restringido a la monitorización de la carga viral (Hamers et al., 2012; Sigaloff et al., 2012); interrupciones del tratamiento (ruptura de adherencia) debido a la falta de suministros de medicamentos a largo plazo y frecuentes interacciones entre medicamentos (Minior et al., 2017; Rhee et al., 2015).

La **adherencia** al tratamiento antirretroviral es clave para una correcta supresión viral. Distintos métodos pueden utilizarse para medir la adherencia, como la renovación de las recetas médicas, contando las pastillas que quedan en el envase. Otra forma de medir la adherencia de los pacientes puede ser la medición de la concentración de medicamentos en los tejidos o fluidos corporales (la Haya, 2018).

Un estudio realizado en Sudáfrica evaluó la falta de adherencia y la asociación con las mutaciones de resistencia cuando las concentraciones del fármaco son subterapéuticas. Afirmaba que el 55% de los pacientes que estaban recibiendo el TAR (EFV/NVP+3TC+ZDV/d4T) como terapia de primera línea, pero que tenían concentraciones subterapéuticas, tenían menos probabilidades de alcanzar la supresión viral si su TAR se cambiaba a una terapia de segunda línea (Johnston et al., 2014). El

hecho de no tener las concentraciones óptimas del TAR potencia la aparición de mutaciones de resistencia. Podemos comparar dichos resultados con los obtenidos en nuestro estudio de adherencia, ya que observamos que la presencia de mutaciones de resistencia era más prevalente en la mayoría de los pacientes con una mala adherencia; en concreto, K103N fue la mutación más prevalente (58%) en el estudio realizado de la cohorte de pacientes VIH+ con información de TAR (n=166).

Según nuestro estudio de regresión multivariante en 90 pacientes VIH+ al analizar la **asociación entre la toma de la medicación autorreferida y la mutación K103N**, observamos una asociación inversa a las puntuaciones más altas de la capacidad de tomar la medicación y una infección con una cepa viral con esta mutación de resistencia. Esta medida de predicción podría ayudar en los lugares donde no hay recursos para una monitorización de carga viral adecuada o la determinación de la carga viral para el seguimiento del TAR. Podría ayudar a realizar cambios en el TAR de forma precoz al analizar las respuestas de los pacientes a los cuestionarios de adherencia, para poder tomar medidas en el caso de estar con una pauta de tratamiento que podría causar fallo terapéutico.

Sin embargo, al analizar la cohorte total de pacientes VIH+ con información de TAR (n=166), observamos que 10 pacientes de los 14 con prevalencia de K103N habían referido una toma de medicación con valores del 6-10 en la escala evaluada (1-10). Esto nos sugiere que para poder predecir y tomar medidas en los cambios de TAR, deberíamos tener en cuenta todas las preguntas de adherencia para poder tomar una decisión clínica correcta.

La buena adherencia al TAR hace que los pacientes obtengan la concentración óptima de los ARVs para una correcta y duradera supresión viral; esto reduce la posibilidad de desarrollar mutaciones de resistencia ya que observamos que olvidarse de tomar la medicación más de 1 día en la última semana estaba asociado con la selección de K103N y M184V principalmente, aunque también se observó la presencia de mutaciones frente a los IPs e INIs en menor medida. Sin embargo, el estudio realizado por *Bangsberg et al* (Gardner et al., 2009; Nachega et al., 2011; Parienti et al., 2010) demuestra que la relación entre la adherencia y la resistencia a los fármacos difiere según la clase de fármaco antirretroviral. De hecho, han demostrado que los regímenes de medicamentos basados en ITINANs tienen más probabilidades de

producir resistencia que los basados en IPs, pero no significa que no se puedan desarrollar resistencias.

Un meta-análisis que revisa los envíos de GeneBank durante 13 años confirma que tener una buena adherencia al TAR y elegir tratamientos con una alta barrera genética, puede disminuir la aparición de nuevas cepas resistentes (Rhee et al., 2015). Por lo tanto, la ausencia de carga viral para el seguimiento del tratamiento en los países en vías de desarrollo puede ser sustituida por esta información autorreferida sobre la adherencia a la terapia para conocer el posible fracaso terapéutico.

Los datos generados a partir de este estudio pueden ayudar en el desarrollo de pautas de TAR combinado para pacientes que experimentan un fracaso del tratamiento basado en inhibidores de la RT en entornos con recursos limitados donde no se dispone de genotipado. Además, apoyan el uso de regímenes alternativos basados en IPs e INIs ya que ayudarían a controlar la propagación de virus resistentes entre las nuevas infecciones por VIH, acercando a RDC a los objetivos 95-95-95 de la OMS para 2030.

El presente estudio tiene una serie de limitaciones. En primer lugar, las DBS no se compararon con el plasma debido a la falta de muestras emparejadas de plasma y DBS recogidas para cada sujeto en la población del estudio. En segundo lugar, sólo se realizaron 135 de las 365 muestras con el ensayo Geenius HIV 1/2. Sin embargo, esta selección aleatoria, junto con la detección del ARN de todas las muestras de DBS, permitió resolver los resultados discrepantes y descartar las infecciones agudas. En cuanto a la evaluación de la carga viral, entre los adultos diagnosticados como VIH positivos o indeterminados por las RDT, un 52% había recibido TAR antes de la toma de muestras. Además, el TAR puede afectar a la sensibilidad de los resultados de las pruebas serológicas. Por otro lado, las condiciones de almacenamiento podrían influir en el análisis de las DBS; sin embargo, las muestras se transportaron en hielo seco y se conservaron a -80°C hasta su uso. Otra limitación del estudio es que las muestras se recogieron en dos hospitales de referencia en Kinshasa, siendo el tamaño muestral del estudio limitado, por tanto, los resultados no son totalmente generalizables ni representativos de la situación en la ciudad y más aún a nivel nacional. Además, todos los participantes incluidos fueron reclutados en el momento de la inscripción, independientemente de la duración del tratamiento y el TAR de parte de ellos era desconocido, pero de acuerdo con los niveles de carga viral suponemos que son pacientes naïve o pacientes en fracaso virológico. Por último, los datos acerca del TAR,

fueron autorreferidos, lo que podría haber introducido un sesgo de mala clasificación de la exposición.

•

6 CONCLUSIONES

1. Las muestras de sangre seca procedentes de Kinshasa permiten realizar el diagnóstico serológico de VIH-1 con una alta sensibilidad y especificidad empleando las técnicas *COBAS Roche* (S: 100%; E: 98,9%) y *Vidas Biomerieux* (S:100%; E: 100%).
2. El test confirmatorio de VIH *Geenius BioRad* realizado a partir de muestras de sangre seca procedentes de la República Democrática del Congo ha mostrado una sensibilidad del 91,7% y una especificidad del 100%, lo que muestra por primera vez su utilidad como técnica confirmatoria de VIH en Kinshasa, un área de alta variabilidad genética del VIH-1.
3. El análisis serológico y molecular de VIH en muestras de DBS procedentes de Kinshasa ha permitido detectar que un 3,9% de los resultados positivos obtenidos mediante pruebas de diagnóstico rápido (PDR) en Kinshasa eran falsos positivos de VIH. Igualmente, un 86,9% de los resultados indeterminados obtenidos mediante PDR en Kinshasa, se han confirmado como VIH negativos.
4. Las muestras de sangre seca procedentes de Kinshasa permiten realizar el diagnóstico serológico de otros agentes infecciosos de transmisión sexual, habiéndose encontrado una prevalencia del 84% para VHA, 4,5% para VHB, 12,1% para VHC, 1,6% para HTLV y 0,5% para sífilis.
5. La técnica de diagnóstico serológico de VHC *Elecsys Anti-HCV(Roche)* mostró una alta sensibilidad (100%) y especificidad (100%) en muestras de sangre seca procedentes de Kinshasa, superior a la técnica *Vidas® Anti-HCV (bioMerieux)*, cuya sensibilidad fue del 61,5% y especificidad del 89,4%.
6. El *buffer SPEX (Roche)* mostró una mejor capacidad de elución de la sangre seca para realizar carga viral de VIH-1 frente al buffer de lisis de *EasyMag (bioMerieux)*, permitiendo detectar ARN de VIH-1 en el 94% y 65% de las muestras, respectivamente.

7. Las técnicas de carga viral de VIH *COBAS Ampliprep/COBAS Taqman (Roche)* y *GeneXpert (Cepheid)* mostraron una correlación alta en la cuantificación de ARN de VIH-1 a partir de muestras de sangre seca obtenidas en Kinshasa.
8. La diversidad de variantes de VIH-1 en Kinshasa es muy elevada con 10 subtipos/sub-subtipos puros diferentes y 20 formas recombinantes distintas detectadas. Los subtipos mayoritarios fueron A (25,2%), G (9%) y C (9%); el 18% de cepas estudiadas correspondieron a formas recombinantes circulantes (principalmente CRF45, CRF02 y CRF27), y el 15,3% eran formas recombinantes únicas (principalmente URF_AU). Se observó un incremento en la presencia del subtipo A y F1, con respecto a estudios previos en Kinshasa.
9. El 42% de pacientes en tratamiento antirretroviral y el 14% de pacientes naïve estaban infectados por cepas de VIH-1 con mutaciones de resistencia en la transcriptasa inversa, principalmente a fármacos ITINANs. Las mutaciones más frecuentemente detectadas fueron K103N (67% en pacientes en tratamiento y 33% en naive) y M184V (19% en pacientes en tratamiento y 0% en naïve). Otras mutaciones en la retrotranscriptasa detectadas en un alto porcentaje fueron: D67N, K70R, V75M, M41L y V108I.
10. Las mutaciones de resistencia a los inhibidores de proteasa estaban presentes en un 6,5% de las secuencias de proteasa estudiadas. Las mutaciones detectadas en este gen fueron M46L, L10F, Q58E, L90M, I47A/V.
11. Las mutaciones de resistencia a los inhibidores de integrasa estaban presentes en un 7,6% de las secuencias estudiadas, sin embargo, ninguna de ellas confería resistencia de alto nivel a los fármacos inhibidores de la integrasa. Las mutaciones detectadas en este gen fueron T66S, T97A, S153F, N155D, E157Q.
12. La adherencia inadecuada al tratamiento autorreferida está asociada con una carga viral elevada y con la selección de cepas de VIH-1 resistentes por el desarrollo de la mutación K103N.

•

-

7 BIBLIOGRAFÍA

- Aberg, J. A., Gallant, J. E., Ghanem, K. G., Emmanuel, P., Zingman, B. S., & Horberg, M. A. (2014). Primary care guidelines for the management of persons infected with HIV: 2013 update by the HIV medicine association of the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 58(1). <https://doi.org/10.1093/cid/cit665>
- Abram, M. E., Ram, R. R., Margot, N. A., Barnes, T. L., White, K. L., Callebaut, C., & Miller, M. D. (2017). Lack of impact of pre-existing T97A HIV-1 integrase mutation on integrase strand transfer inhibitor resistance and treatment outcome. *PLoS ONE*, 12(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172206>
- Aguilera Guirao A, Álvarez Estévez M, García García F, Reina González G, & Rodríguez Martín C. (2014). Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH. In *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*. www.seimc.org
- Aibekova, L., Foley, B., Hortelano, G., Raees, M., Abdraimov, S., Toichuev, R., & Ali, S. (2018). Molecular epidemiology of HIV-1 subtype A in former Soviet Union countries. *PLoS ONE*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191891>
- Alcamí, J. (2008). Ciclo replicativo del VIH. Dianas terapéuticas consolidadas y dianas potenciales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 26(12), 3–10.
- Alcamí, J., & Coiras, M. (2011). Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(3), 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.01.006>
- Alessandri-Gradt, E., Unal, G., Baron, A., Leoz, M., Gueudin, M., & Plantier, J.-C. (2021). Performance Analysis of Three Commercial Kits Designed for RNA Quantification of HIV-1 Group O Variants the RES-O Network. *J Acquired Immune Defic Syndr*, 88(2), 220–227. <http://links.lww.com/QAI/B692>
- Alexiev, I., Io Presti, A., Dimitrova, R., Foley, B., Gancheva, A., Kostadinova, A., Nikolova, L., Angeletti, S., Cella, E., Elenkov, I., Stoycheva, M., Nikolova, D., Doychinova, T., Pekova, L., & Ciccozzi, M. (2018). Origin and Spread of HIV-1 Subtype B among Heterosexual Individuals in Bulgaria. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 34(3), 244–253. <https://doi.org/10.1089/aid.2017.0167>
- Allen, T. M., & Altfield, M. (2003). HIV-1 superinfection. *J Allergy Clin Immunol*, 112(5), 821–835. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1821>
- Al-Majed, A. A., Bakheit, A. H. H., Al-Qahtani, B. M., Al-Kahtani, H. M., & Abdelhameed, A. S. (2020). Emtricitabine. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (Vol. 45, pp. 55–91). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2019.10.003>
- Alvarez, P., Martín, L., Prieto, L., Obiang, J., Vargas, A., Avedillo, P., Rojo, P., McPhee, C. F., Benito, A., Ramos, J. T., & Holguín, Á. (2015). HIV-1 variability and viral load technique could lead to false positive HIV-1 detection and to erroneous viral quantification in infected specimens. *Journal of Infection*, 71(3), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.05.011>

- Alvarez, P., Prieto, L., Martín, L., Obiang, J., Avedillo, P., Vargas, A., Rojo, P., Fernández McPhee, C., Canalejas, L. S., Benito, A., Ramos, J. T., & Holguín, Á. (2017). Evaluation of four commercial virological assays for early infant HIV-1 diagnosis using dried blood specimens. *Pediatric Research*, *81*(1), 80–87. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.183>
- Alvarez-Muñoz, M. T., Zaragoza-Rodríguez, S., Rojas-Montes, O., Palacios-Saucedo, G., Vázquez-Rosales, G., Gómez-Delgado, A., Torres, J., & Muñoz, O. (2005). High correlation of human immunodeficiency virus type-1 viral load measured in dried-blood spot samples and in plasma under different storage conditions. *Archives of Medical Research*, *36*(4), 382–386. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.03.010>
- Andreotti, M., Pirillo, M., Guidotti, G., Ceffa, S., Paturzo, G., Germano, P., Luhanga, R., Chimwaza, D., Mancini, M. G., Marazzi, M. C., Vella, S., Palombi, L., & Giuliano, M. (2010). Correlation between HIV-1 viral load quantification in plasma, dried blood spots, and dried plasma spots using the Roche COBAS Taqman assay. *Journal of Clinical Virology*, *47*(1), 4–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.11.006>
- Ann, H., Kim, K. H., Choi, H. Y., Chang, H. H., Han, S. H., Kim, K. H., Lee, J. S., Kim, Y. S., Park, K. H., Kim, Y. K., Sohn, J. W., Yun, N. R., Lee, C. S., Choi, Y. W., Lee, Y. S., & Kim, S. W. (2017). Safety and efficacy of Ziagen (abacavir sulfate) in HIV-infected Korean patients. *Infection and Chemotherapy*, *49*(3), 205–212. <https://doi.org/10.3947/ic.2017.49.3.205>
- Anstett, K., Cutillas, V., Fusco, R., Mesplède, T., & Wainberg, M. A. (2016). Polymorphic substitution E157Q in HIV-1 integrase increases R263K-mediated dolutegravir resistance and decreases DNA binding activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71*(8), 2083–2088. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw109>
- Arimide, D. A., Abebe, A., Kebede, Y., Adugna, F., Tilahun, T., Kassa, D., Assefa, Y., Balcha, T. T., Björkman, P., & Medstrand, P. (2018). HIV-genetic diversity and drug resistance transmission clusters in Gondar, Northern Ethiopia, 2003-2013. *PLoS ONE*, *13*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205446>
- Armstrong-Mensah, E., Tetteh, A., & Choi, S. (2020). Utilization of Rapid Diagnostic Testing in sub-Saharan Africa: Challenges and Effects on HIV Prevention. *International Journal of Maternal and Child Health and AIDS (IJMA)*, *10*(1), 1–6. <https://doi.org/10.21106/ijma.423>
- Arribas Rosa Polo, J. R., & Martínez Juan González García, E. (2020). *DOCUMENTO DE CONSENSO DE GeSIDA/PLAN NACIONAL SOBRE EL SIDA RESPECTO AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN ADULTOS INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA*.
- Arts, E. J., & Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007161>
- Arvieux, C., & Tribut, O. (2005). Amprenavir or Fosamprenavir plus Ritonavir in HIV Infection Pharmacology, Efficacy and Tolerability Profile. *Drugs*, *65*(5), 633–659.

- Ayouba, A., * Philippe Maucière, * Paul M.V. Martin, * Patrick Cunin, * Jermie Mfoupouendoun, * Bernadette Njinku, * Sandrine Souquière†, & François Simont†. (2001). HIV-1 Group O Infection in Cameroon, 1986–1998. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 466–467.
- Bailey, J., Blankson, J. N., Wind-Rotolo, M., & Siliciano, R. F. (2004). Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Current Opinion in Immunology*, 16(4), 470–476. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.05.005>
- Bbosa, N., Kaleebu, P., & Ssemwanga, D. (2019). HIV subtype diversity worldwide. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 14(3), 153–160. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000534>
- Bennet, D., Myatt, M., Bertagnolio, S., Sutherland, D., & Gilks, C. F. (2008). Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antiviral Therapy*, 2(25), 25–36. <https://www.researchgate.net/publication/5279493>
- Bertagnolio, S., Parkin, N. T., Jordan, M., Brooks, J., & Gerardo García-Lerma, J. (2010). Dried Blood Spots for HIV-1 Drug Resistance and Viral Load Testing Dried blood spots for HIV-1 Drug Resistance and Viral Load Testing: A Review of Current Knowledge and WHO Efforts for Global HIV Drug Resistance Surveillance. *AIDS*, 12, 195–208. <http://www.>
- Bezemer, D., Blenkinsop, A., Hall, M., van Sighem, A., Cornelissen, M., Wessels, E., van Kampen, J., van der Laar, T., Reiss, P., Fraser, C., & Ratmann, O. (2021). In-country acquisition of HIV-1 non-B infection within the Netherlands is frequent, but results in limited onward transmission. *AIDS*. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000003074>
- Bibollet-Ruche, F., Peeters, M., Mboup, S., Ekaza, E., Gandji, R., Torimiro, J., Mpoudi, E. N., Amblard, J., Dibanga, G., Saidou, M., Esu-Williams, E., Haesevelde, M. vanden, Saman, E., & Delaporte, E. (1998). Characterization of the Envelope Transmembrane Glycoprotein of 13 New Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group O Strains from Six Different African Countries. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES*, 14(14), 1281–1285.
- Blackard, J. T., Cohen, D. E., & Mayer, K. H. (2002). Human Immunodeficiency Virus Superinfection and Recombination: Current State of Knowledge and Potential Clinical Consequences. *Clinical Infectious Diseases; HIV AIDS*, 34, 1108–1114. <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/34/8/1108/283664>
- Boillot, F., Serrano, L., Muwonga, J., Kabuayi, J. P., Kambale, A., Mutaka, F., Fujiwara, P. I., Decosas, J., Peeters, M., & Delaporte, E. (2016). IMPLEMENTATION AND OPERATIONAL RESEARCH: EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION Programmatic Feasibility of Dried Blood Spots for the Virological Follow-up of Patients on Antiretroviral Treatment in Nord Kivu, Democratic Republic of the Congo. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 71(1), 9–15. www.hivfrenchresistance.org/
- Bor, J., Herbst, A. J., Newel, M.-L., & Barnighausen, T. (2013). Increases in Adult Life Expectancy in Rural South Africa: Valuing the Scale-Up of HIV Treatment. *Science*, 339(6122), 959–961. <https://doi.org/10.1126/science.1230062>

- Bossard, C., Schramm, B., Wanjala, S., Jain, L., Mucinya, G., Opollo, V., Wiesner, L., van Cutsem, G., Poulet, E., Szumilin, E., Ellman, T., & Maman, D. (2021). High Prevalence of NRTI and NNRTI Drug Resistance Among ART-Experienced, Hospitalized Inpatients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *87*(3), 883–888. www.jaids.com
- Brambilla, D., Jennings, C., Aldrovandi, G., Bremer, J., Comeau, A. M., Cassol, S. A., Dickover, R., Jackson, J. B., Pitt, J., Sullivan, J. L., Butcher, A., Grosso, L., Reichelderfer, P., & Fiscus, S. A. (2003). Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: Measurement, precision, and RNA stability. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(5), 1888–1893. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.1888-1893.2003>
- Brazier, E., Maruri, F., Duda, S. N., Tymejczyk, O., Wester, C. W., Somi, G., Ross, J., Freeman, A., Cornell, M., Poda, A., Musick, B. S., Zhang, F., Althoff, K. N., Mugglin, C., Kimmel, A. D., Yotebieng, M., & Nash, D. (2019). Implementation of “Treat-all” at adult HIV care and treatment sites in the Global IeDEA Consortium: results from the Site Assessment Survey. *Journal of International AIDS Society*, *22*. <https://doi.org/10.1002/jia2.25331/full>
- Brenner, B. G., Ibanescu, R. I., Osman, N., Cuadra-Foy, E., Oliveira, M., Chaillon, A., Stephens, D., Hardy, I., Routy, J. P., Thomas, R., Baril, J. G., Leblanc, R., Tremblay, C., & Roger, M. (2021). The role of phylogenetics in unravelling patterns of hiv transmission towards epidemic control: The quebec experience (2002–2020). *Viruses*, *13*(8). <https://doi.org/10.3390/v13081643>
- Brenner, B., Turner, D., Oliveira, M., Moisi, D., Detorio, M., Carobene, M., Marlink, R. G., Schapiro, J., Roger, M., & Wainberg, M. A. (2003). A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Lippincott Williams & Wilkins AIDS*, *17*, 1–5. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000042957.95433.6c>
- Briggs, J. A. G., & Kräusslich, H. G. (2011). The molecular architecture of HIV. *Journal of Molecular Biology*, *410*(4), 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.021>
- Briones, C., & Domingo, E. (2008). Minority Memory Genomes in HIV-1 93 Minority Report: Hidden Memory Genomes in HIV-1 Quasispecies and Possible Clinical Implications. *AIDS*, *10*, 93–109.
- Briz, V., Poveda, E., & Soriano, V. (2006). HIV entry inhibitors: Mechanisms of action and resistance pathways. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *57*(4), 619–627. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl027>
- Buckton, A. J. (2008). New methods for the surveillance of HIV drug resistance in the resource poor world. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *21*(6), 653–658. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283186d1a>
- Burgos, J., Ribera, E., & Falcó, V. (2018). Antiretroviral therapy in advanced hiv disease: Which is the best regimen? *AIDS Reviews*, *20*(1), 3–12. <https://doi.org/10.24875/AIDSRev.M17000010>

- Cabrera, C., Cozzi-Lepri, A., Phillips, A. N., Loveday, C., Kirk, O., Ait-Khaled, M., Reiss, P., Kjaer, J., Ledergerber, B., Lundgren, J. D., Clotet, B., & Ruiz, L. (2014). Baseline resistance and virological outcome in patients with virological failure who start a regimen containing abacavir: EuroSIDA study. *International Medical Press, 9*, 787–800. <http://www.ablnet->
- Campbell-Yesufu, O. T., & Gandhi, R. T. (2011). Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clinical Infectious Diseases, 52*(6), 780–787. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq248>
- Candotti, D., Sauvage, V., Cappy, P., Boullahi, M. A., Bizimana, P., Mbensa, G. O., Oumar Coulibaly, S., Rakoto Alson, A. O., Soumana, H., Tagny-Tayou, C., Murphy, E. L., & Laperche, S. (2020). High rate of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus false-positive results in serologic screening in sub-Saharan Africa: adverse impact on the blood supply. *Transfusion, 60*(1), 106–116. <https://doi.org/10.1111/trf.15593>
- Caniglia, E. C. S., Caroline Sabin, P., James M. Robins, M., Roger Logan, P., Lauren E. Cain, P., Sophie Abgrall, M., Michael J. Mugavero, M., Sonia Hernandez-Diaz, D., Laurence Meyer, P., Remonie Seng, M., Daniel R. Drozd, M., George R. Seage, I. S., Fabrice Bonnet, M., Francois Dabis, P., Richard R. Moore, M., Peter Reiss, M., Ard van Sighem, P., William C. Mathews, M., Julia del Amo, M., ... Miguel A. Hernán, D. (2016). When to Monitor CD4 Cell Count and HIV RNA to Reduce Mortality and AIDS-Defining Illness in Virologically Suppressed HIV-Positive Persons on Antiretroviral Therapy in High-Income Countries: A Prospective Observational Study. *JAIDS, 72*, 214–221.
- Carey, D., Amin, J., Boyd, M., Petoumenos, K., & Emery, S. (2010). Lipid profiles in HIV-infected adults receiving atazanavir and atazanavir/ritonavir: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65*(9), 1878–1888. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq231>
- Castley, A., Sawleshwarkar, S., Varma, R., Herring, B., Thapa, K., Dwyer, D., Chibo, D., Nguyen, N., Hawke, K., Ratcliff, R., Garsia, R., Kelleher, A., & Nolan, D. (2017). A national study of the molecular epidemiology of HIV-1 in. *PLoS ONE, 12*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170601>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). *Shipping Guidelines for Dried-Blood Spot Specimens*. https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/nsqap/Bloodspot_Transportation_Guidelines.Pdf. https://pe.usps.com/text/pub52/pub52c3_024.htm?q=infectious&t=H
- Charneau, P., Borman, A. M., Quillent, C., Guétard, D., Chamaret, S., Cohen, J., Remy, G., Montagnier, L., & Clavel, F. (1994). Isolation and Envelope Sequence of a Highly Divergent HIV-1 Isolate: Definition of a New HIV-1 Group. *Virology, 205*, 247–253.
- Charpentier, C., Malet, I., Andre-Garnier, E., Storto, A., Bocket, L., Amiel, C., Morand-Joubert, L., Tumiotto, C., Nguyen, T., Maillard, A., Rodallec, A., Leoz, M., Montes, B., Véronique Schneider, Plantier, J. C., Dina, J., Pallier, C., Mirand, A., Roussel, C., ... Descamps, D. (2018). Phenotypic analysis of HIV-1 E157Q integrase polymorphism and impact on virological

- outcome in patients initiating an integrase inhibitor-based regimen. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(4), 1039–1044. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx511>
- Chun, H. M., Obeng-Aduasare, Y. F., Broyles, L. N., & Ellenberger, D. (2017). Expansion of Viral Load Testing and the Potential Impact on Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance. *Journal of Infectious Diseases*, 216, S808–S811. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix404>
- Chun, T.-W., Lucy Carruth*, Diana Finzi*, Xuefei Shen*, Joseph A. DiGiuseppet, Harry Taylor*, Monika Hermankova*, Karen Chadwick+, Joseph Margolick:J., Thomas C. Quinn*§, Yen-Hong Kuoll, Ronald Brookmeyerll, Martha A. Zeiger'", Patricia Barditch-Crovo*, & Robert F. Siliciano*. (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*, 387, 183–188.
- Clavel, F., DENISE GUETARD, FRANÇOISE BRUN-VEZINET, SOPHIE CHAMARET, MARIE-ANNE REY, M. O. SANTOS-FERREIRA, ANNE G. LAURENT, CHARLÈS DAUGUET, CHRISTINE KATLAMA, CHRISTINE Rouzloux, DAVID KLATZMANN, J. L. CHAMPALIMAUD, & Luc MONTAGNIER. (1986). Isolation of a New Human Retrovirus African Patients with AIDS. *Science*, 233, 343–346.
- Clavel, F., & Hance, A. J. (2004). HIV Drug Resistance. *The New England Journal of Medicine*, 350(10), 1023–1035. www.nejm.org
- Clumeck, N., Mwamba, C., Kabeya, K., Matanda, S., Vaira, D., Necsoi, C., Kadiebwe, D., Delforge, M., Kasamba, E., Milolo, C., Ilungab, J., & Kapend, L. (2014). First-line antiretroviral therapy with nevirapine versus lopinavir-ritonavir based regimens in a resource-limited setting. *AIDS*, 28(8), 1143–1153. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000214>
- Clutter, D. S., Jordan, M. R., Bertagnolio, S., & Shafer, R. W. (2016). HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infection, Genetics and Evolution*, 46, 292–307. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.031>
- Cohen, M. S., Chen, Y. Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M. C., Kumarasamy, N., Hakim, J. G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J. H. S., Godbole, S. v., Chariyalertsak, S., Santos, B. R., Mayer, K. H., Hoffman, I. F., Eshleman, S. H., Piwowar-Manning, E., Cottle, L., Zhang, X. C., ... Fleming, T. R. (2016). Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. *New England Journal of Medicine*, 375(9), 830–839. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1600693>
- Cohen, M. S., Shaw, G. M., McMichael, A. J., & Haynes, B. F. (2011). Acute HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine*, 364(20), 1943–1954. <https://doi.org/10.1056/nejmra1011874>
- Coiras, M., López-Huertas, M. R., Pérez-Olmeda, M., & Alcamí, J. (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nature Reviews Microbiology*, 7(11), 798–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2223>
- Colombier, M. A., & Molina, J. M. (2018). Doravirine: A review. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 13(4), 308–314. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000471>

- Cuevas, J. M., Geller, R., Garijo, R., López-Aldeguer, J., & Sanjuán, R. (2015). Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. *PLoS Biology*, 13(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002251>
- Dampier, W., Nonnemacher, M. R., Mell, J., Earl, J., Ehrlich, G. D., Pirrone, V., Aiamkitsumrit, B., Zhong, W., Kercher, K., Passic, S., Williams, J. W., Jacobson, J. M., & Wigdahl, B. (2016). HIV-1 genetic variation resulting in the development of new quasispecies continues to be encountered in the peripheral blood of well-suppressed patients. *PLoS ONE*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155382>
- Davis, C., Mgomella, G. S., Da, A., Filipe, S., Frost, E. H., Giroux, G., Hughes, J., Hogan, C., Kaleebu, P., Asiki, G., Mclachlan, J., Niebel, M., Ocama, P., Pomila, C., Pybus, O. G., Pépin, J., Simmonds, P., Singer, J. B., Sreenu, V. B., ... Thomson, E. C. (2019). Highly Diverse Hepatitis C Strains Detected in Sub-Saharan Africa Have Unknown Susceptibility to Direct-Acting Antiviral Treatments. *Hepatology*, 69(4), 1426–1441. <https://doi.org/10.1002/hep.30342/supinfo>
- de Clercq, E. (2016). Tenofovir alafenamide (TAF) as the successor of tenofovir disoproxil fumarate (TDF). *Biochemical Pharmacology*, 119, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.04.015>
- de Cock, K. M., Adjarlolo, G., Ekpini, E., Sibailly, T., Kouadio, J., Maran, M., Brattegaard, K., Vetter, K. M., Doorly, R., & Gayle, H. D. (1993). Epidemiology and Transmission of HIV-2 Why There Is No HIV-2 Pandemic. *Journal of the American Medical Association*, 270(17), 2083–2086. <http://jama.jamanetwork.com/>
- de Leys, R., Vanderborght, Marleen Vanden Haesevelde, B., Heyndrickx, Anja Van Geel, L., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., Willems, B., Taelman, H., van der Groen, G., Piot, P., Tersmette, T., Huisman, J. G., & van Heuverswyn, H. (1990). Isolation and Partial Characterization of an Unusual Human Immunodeficiency Retrovirus from Two Persons of West-Central African Origin. *Journal of Virology*, 64(3), 1207–1216.
- de Mendoza, C., Lozano, A. B., Caballero, E., Cabezas, T., Ramos, J. M., & Soriano, V. (2020). Antiretroviral therapy for HIV-2 infection in non-endemic regions. *AIDS Reviews*, 22(1), 44–56. <https://doi.org/10.24875/AIDSRev.M20000029>
- de Mulder, M., & Holguín, Á. (2013). Utilidad de los dried blood spots para monitorizar la infección por virus de la inmunodeficiencia humana en los programas de salud pública de países en desarrollo. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(2), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.03.008>
- de Oliveira, F., Cappy, P., Lemée, V., Moisan, A., Pronier, C., Bocket, L., Bouvier-Alias, M., Chaix, M. L., Gault, E., Morvan, O., Poveda, J. D., Schneider, V., Wirden, M., Alessandri-Gradt, E., Mourez, T., & Plantier, J. C. (2018). Detection of numerous HIV-1/MO recombinants in France. *AIDS*, 32(10), 1289–1299. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001814>
- de Oliveira, F., Mourez, T., Vessiere, A., Ngoupo, P. A., Alessandri-Gradt, E., Simon, F., Rousset, D., & Plantier, J. C. (2017). Multiple HIV-1/M + HIV-1/O dual infections and new HIV-1/MO

- inter-group recombinant forms detected in Cameroon. *Retrovirology*, 14(1).
<https://doi.org/10.1186/s12977-016-0324-3>
- Deeks, E. D. (2014a). Cobicistat: A review of its use as a pharmacokinetic enhancer of atazanavir and darunavir in patients with HIV-1 infection. *Drugs*, 74(2), 195–206.
<https://doi.org/10.1007/s40265-013-0160-x>
- Deeks, E. D. (2014b). Elvitegravir: A review of its use in adults with HIV-1 infection. *Drugs*, 74(6), 687–697. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0206-8>
- Delaporte Eric, Janssens, W., Peeters, M., Buvé, A., Dibanga, G., Perret, J. L., Ditsambou, V., Mba, J. R., Courbot, M. C. G., Geroges, A., Bourgeois, A., Samb, B., Henzel, D., Heyndrickx, L., Fransen, K., van der Groen, G., & Larouzé, B. (1996). Epidemiological and molecular characteristics of HIV infection in Gabon, 1986-1994. *AIDS*, 10, 903–910.
- Delaugerre, C., Simon, F., Delaugerre, C., de Oliveira, F., Lascoux-Combe, C., Plantier, J.-C., & Simon, F. (2011). HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. In *Lancet* (Vol. 378).
www.thelancet.com
- Delgado, R. (2011). Virological characteristics of HIV. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.10.001>
- Descamps, D., Collin, G., Letourneur, F., Apetrei, C., Damond, F., Loussert-ajaka, I., Ois Simon, F., Saragosti, S., & Oise Brun-vé Zinet, F. (1997). Susceptibility of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group O Isolates to Antiretroviral Agents: In Vitro Phenotypic and Genotypic Analyses. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 71(11), 8893–8898. <http://jvi.asm.org/>
- Diaz, R. S., Sabino, E. C., Mayer, ‡ Allen, Mosley, J. W., Busch, M. P., & The, A. (1995). Dual Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Recombination in a Dually Exposed Transfusion Recipient. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 69(6), 3273–3281.
- Ditekemena, J., Luhata, C., Bonane, W., Kiumbu, M., Tshetu, A., Colebunders, R., & Koole, O. (2014). Antiretroviral treatment program retention among HIV-infected children in the Democratic Republic of Congo. *PLoS ONE*, 9(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113877>
- Djoko, C. F., Rimoin, A. W., Vidal, N., Tamoufe, U., Wolfe, N. D., Butel, C., Lebreton, M., Tshala, F. M., Kayembe, P. K., Muyembe, J. J., Edidi-Basepeo, S., Pike, B. L., Fair, J. N., Mbacham, W. F., Saylor, K. E., Mpoudi-Ngole, E., Delaporte, E., Grillo, M., & Peeters, M. (2011). High HIV type 1 group M pol diversity and low rate of antiretroviral resistance mutations among the uniformed services in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 27(3), 323–329. <https://doi.org/10.1089/aid.2010.0201>
- Domingo, E., Baranowski, E., Nunez, J. I., Ruiz-Jarabo, C. M., Sierra, S., Molina, N., & Sobrino, F. (2000). Cuasiespecies y evolución molecular de virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 19(1), 55–63.
- Domingo, E., & Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS Genetics*, 15(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008271>

- Drusano, G. L., Bilello, J. A., Stein, D. S., Nessly, M., Meibohm, A., Emini, E. A., Deutsch, P., Condra, J., Chodakewitz, J., & Holder, D. J. (1998). Factors influencing the emergence of resistance to indinavir: Role of virologic, immunologic, and pharmacologic variables. *Journal of Infectious Diseases*, *178*(2), 360–367. <https://doi.org/10.1086/515631>
- Dupwa, B., Kumar, A. M. V., Tripathy, J. P., Mugurungi, O., Takarinda, K. C., Dzangare, J., Bara, H., & Mukeredzi, I. (2019). Retesting for verification of HIV diagnosis before antiretroviral therapy initiation in Harare, Zimbabwe: Is there a gap between policy and practice? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *113*(10), 610–616. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz047>
- Eaton, J. W., Johnson, C. C., & Gregson, S. (2017). The Cost of Not Retesting: Human Immunodeficiency Virus Misdiagnosis in the Antiretroviral Therapy “Test-and-Offer” Era. *Clinical Infectious Diseases*, *65*(3), 522–525. <https://doi.org/10.1093/cid/cix341>
- Emu, B., Fessel, J., Schrader, S., Kumar, P., Richmond, G., Win, S., Weinheimer, S., Marsolais, C., & Lewis, S. (2018). Phase 3 Study of Ibalizumab for Multidrug-Resistant HIV-1. *New England Journal of Medicine*, *379*(7), 645–654. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1711460>
- Eron, J. J. Jr., M., Ronald J. Bosch, P., Daniel Bettendorf, M., Leslie Petch, P., Susan Fiscus, P., & Ian Frank, M. (2007). The Effect of Lamivudine Therapy and M184V on the Antiretroviral Activity of Didanosine. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *45*, 247–255. <http://journals.lww.com/jaids>
- Eusebio-Ponce, E., Eduardo Anguita, Robert Paulino-Ramirez, & Francisco Javier Candel. (2019). HTLV-1 infection: An emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases. *Journal of the Spanish Society of Chemotherapy*, *32*(6), 485–496.
- Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., Tatem, A. J., Sousa, J. D., Arinaminpathy, N., Pépin, J., Posada, D., Peeters, M., Pybus, O. G., & Lemey, P. (2014). The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*, *346*(6205), 56–61. <https://doi.org/10.1126/science.1256739>
- Fernández McPhee, C., Álvarez, P., Prieto, L., Obiang, J., Avedillo, P., Vargas, A., Rojo, P., Abad, C., Ramos, J. T., & Holguín, A. (2015). HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 confirmatory assay. *Journal of Clinical Virology*, *63*, 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.12.018>
- Fernando Bernal, Q. F. (2016). FARMACOLOGÍA DE LOS ANTIRRETROVIRALES. *Revista Clínica Médica Condes*, *27*(5), 682–697.
- Fisher, E. J., Chaloner, K., Cohn, D. L., Grant, L. B., Alston, B., Brosgart, C. L., Schmetter, B., El-Sadr, W. M., & Sampson, J. (2001). The safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients with advanced HIV disease: a randomized, placebo-controlled trial. *AIDS*, *15*(13), 1695–1700.
- Foley, B., Leitner, T., Apetrei, C., Hahn, B., Mizrachi, I., Mullins, J., Rambaut, A., Wolinsky, S., Korber, B., Singh, A., Abfalterer, W., Giori, E. E., Fischer, W., Hraber, P., Macke, J., Szinger, J. J., Wagh, K., & Yoon, H. (2018). *HIV Sequence Compendium 2018 Contracting Officer's*

Representative Los Alamos HIV Sequence Database and Analysis Staff.
<https://www.hiv.lanl.gov/>

- Ford, N., Migone, C., Calmy, A., Kerschberger, B., Kanfers, S., Nsanzimana, S., Mills, E. J., Meintjes, G., Vitoria, M., Doherty, M., & Shubber, Z. (2018). Benefits and risks of rapid initiation of antiretroviral therapy. *AIDS*, 32(1), 17–23. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001671>
- Ford, N., Stinson, K., Gale, H., Mills, E. J., Stevens, W., González, M. P., Markby, J., & Hill, A. (2015). CD4 changes among virologically suppressed patients on antiretroviral therapy: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the International AIDS Society*, 18(1). <https://doi.org/10.7448/IAS.18.1.20061>
- Foster, R. H., & Faulds, D. (1998). Abacavir. *ADIS NEW DRUG PROFILE*, 55(5), 729–736.
- Fraser, C., Lythgoe, K., Leventhal, G. E., Shirreff, G., Hollingsworth, T. D., Alizon, S., & Bonhoeffer, S. (2014). Virulence and pathogenesis of HIV-1 infection: An evolutionary perspective. *Science*, 343(6177). <https://doi.org/10.1126/science.1243727>
- Fung, H. B., Stone, E. A., & Piacenti, F. J. (2002). New Drugs Tenofovir Disoproxil Fumarate: A Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor for the Treatment of HIV Infection. *CLINICALTHERAPEUTICSVVOL*, 24(10), 1515–1548.
- Gallant, J. E. (2006). The M184V mutation: What it does, how to prevent it, and what to do with it when it's there. *AIDS*, 16, 556–559. <https://www.researchgate.net/publication/6701881>
- Galletto, R., & Negroni, M. (2005). Mechanistic features of recombination in HIV. *AIDS*, 7, 92–102. <https://www.researchgate.net/publication/7666865>
- Gao, F. (1999). Origin of HIV-1. *Nature*, 397, 436–441.
- Gao, F., Robertson, D. L., Morrison, S. G., Hui, H., Craig, S., Decker, J., Fultz, P. N., Girard, M., Shaw, G. M., Hahn, B. H., & Sharp, P. M. (1996). The Heterosexual Human Immunodeficiency Virus Type 1 Epidemic in Thailand Is Caused by an Intersubtype (A/E) Recombinant of African Origin. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 70(10), 7013–7029.
- García, F., Álvarez, M., Bernal, C., Chueca, N., & Guillot, V. (2011). Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(4), 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.12.006>
- Gardner, E. M., Burman, W. J., Steiner, J. F., Anderson, P. L., & Bangsberg, D. R. (2009). Antiretroviral medication adherence and the development of class-specific antiretroviral resistance. *AIDS*, 23(9), 1035–1046. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832ba8ec>
- Gartner, M. J., Roche, M., Churchill, M. J., Gorry, P. R., & Flynn, J. K. (2020). Understanding the mechanisms driving the spread of subtype C HIV-1. *EBioMedicine*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102682>

- Geretti, A. M., Armenia, D., & Ceccherini-Silberstein, F. (2012). Emerging patterns and implications of HIV-1 integrase inhibitor resistance. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25(6), 677–686. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32835a1de7>
- Ghosn, J., Chaix, M.-L., & Delaugerre, C. (2010). HIV-1 Resistance to First-and Second-Generation Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *AIDS*, 11, 165–173. www.iasusa.org
- Gianella, S., & Richman, D. D. (2010). Minority variants of drug-resistant HIV. *Journal of Infectious Diseases*, 202(5), 657–666. <https://doi.org/10.1086/655397>
- Gilks, C. F., Crowley, S., Ekpini, R., Gove, S., Perriens, J., Souteyrand, Y., Sutherland, D., Vitoria, M., Guerna, T., & de Cock, K. (2006). The WHO public-health approach to antiretroviral treatment against HIV in resource-limited settings. *The Lancet*, 368, 505–510. www.thelancet.com
- Gils, T., Bossard, C., Verdonck, K., Owiti, P., Casteels, I., Mashako, M., van Cutsem, G., & Ellman, T. (2018). Stockouts of HIV commodities in public health facilities in Kinshasa: Barriers to end HIV. *PLoS ONE*, 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191294>
- González-Alba, J. M., Rodríguez-Domínguez, M., & Mateos Lindemann, M. L. (2011). Determinación de la carga viral del VIH-1. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(SUPPL. 3), 47–50. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70027-1](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70027-1)
- Gottlieb, G. S., Raugi, D. N., & Smith, R. A. (2018). 90-90-90 for HIV-2? Ending the HIV-2 epidemic by enhancing care and clinical management of patients infected with HIV-2. *The Lancet HIV*, 5(7), e390–e399. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(18\)30094-8](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(18)30094-8)
- Gounder, K., Oyaro, M., Padayachi, N., Zulu, T. M., de Oliveira, T., Wylie, J., & Ndung'u, T. (2017). Complex subtype diversity of HIV-1 among drug users in Major Kenyan cities. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 33(5), 500–510. <https://doi.org/10.1089/aid.2016.0321>
- Grau-Expósito, J., Luque-Ballesteros, L., Navarro, J., Curran, A., Burgos, J., Ribera, E., Torrella, A., Planas, B., Badía, R., Martín-Castillo, M., Fernández-Sojo, J., Genescà, M., Falcó, V., & Buzon, M. J. (2019). Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4+ t subpopulations. *PLoS Pathogens*, 15(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007991>
- Greene, W. C. (1991). The Molecular Biology of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *The New England Journal of Medicine*, 324, 308–317.
- Gregson, J., Tang, M., Ndembu, N., Hamers, R. L., Marconi, V. C., Brooks, K., Theys, K., Arruda, M., Garcia, F., Monge, S., Kanki, P. J., Kumarasamy, N., Kerschberger, B., Mor, O., Charpentier, C., Todesco, E., Rokx, C., Gras, L., Halvas, E. K., ... Murakami-Ogasawara, A. (2016). Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: A multicentre retrospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(5), 565–575. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00536-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00536-8)
- Gregson, S., Moorhouse, L., Dadirai, T., Sheppard, H., Mayini, J., Beckmann, N., Skovdal, M., Dzangare, J., Moyo, B., Maswera, R., Pinsky, B. A., Mharakurwa, S., Francis, I., Mugurungi,

- O., & Nyamukapa, C. (2021). *Comprehensive investigation of sources of misclassification errors in routine HIV testing in Zimbabwe*. <https://doi.org/10.1002/jia2.25700/full>
- Grobler, J., Gray, C. M., Rademeyer, C., Seoighe, C., Ramjee, G., Karim, S. A., Morris, L., & Williamson, C. (2004). Incidence of HIV-1 Dual Infection and Its Association with Increased Viral Load Set Point in a Cohort of HIV-1 Subtype C-Infected Female Sex Workers. *The Journal of Infectious Diseases*, *190*, 1355–1359.
- Grossman, Z., Paxinos, E. E., Averbuch, D., Maayan, S., Parkin, N. T., Engelhard, D., Lorber, M., Istomin, V., Shaked, Y., Mendelson, E., Ram, D., Petropoulos, C. J., & Schapiro, J. M. (2004). Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(6), 2159–2165. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2159-2165.2004>
- Günthard, H. F., Calvez, V., Paredes, R., Pillay, D., Shafer, R. W., Wensing, A. M., Jacobsen, D. M., & Richman, D. D. (2019). Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *Clinical Infectious Diseases*, *68*(2), 177–187. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy463>
- Gupta, R. K., Gregson, J., Parkin, N., Haile-Selassie, H., Tanuri, A., Andrade Forero, L., Kaleebu, P., Watera, C., Aghokeng, A., Mutenda, N., Dzangare, J., Hone, S., Hang, Z. Z., Garcia, J., Garcia, Z., Marchorro, P., Beteta, E., Giron, A., Hamers, R., ... Bertagnolio, S. (2018). HIV-1 drug resistance before initiation or re-initiation of first-line antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-regression analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*(3), 346–355. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30702-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30702-8)
- Gupta, R. K., Hill, A., Sawyer, A. W., Cozzi-Lepri, A., von Wyl, V., Yerly, S., Lima, V. D., Günthard, H. F., Gilks, C., & Pillay, D. (2009). Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, *9*(7), 409–417. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70136-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70136-7)
- Gutiérrez, F., Carlos Rodríguez, J., García, F., & Poveda, E. (2011). Methods for determination of HIV tropism and their clinical use. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *29*(SUPPL. 5), 45–50. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70043-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70043-X)
- Hägglom, A., Svedhem, V., Singh, K., Sönnernborg, A., & Neogi, U. (2016). Virological failure in patients with HIV-1 subtype C receiving antiretroviral therapy: an analysis of a prospective national cohort in Sweden. *The Lancet HIV*, *3*(4), e166–e174. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(16\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(16)00023-0)
- Hallen, A. H., Samuelson, A., Nordin, M., Albert, J., & Bogdanovic, G. (2014). Evaluation of bio-rad geenius HIV-1 and -2 assay as a confirmatory assay for detection of HIV-1 and -2 antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, *21*(8), 1192–1194. <https://doi.org/10.1128/VI.00153-14>
- Hamers, R. L., Africa L Wallis, S. C., Stevens MMed, W. S., Hamers, R. L., Wallis, C. L., Kityo, C., Siwale, M., & Mandaliya, K. (2011). HIV-1 drug resistance in antiretroviral-naïve individuals

- in sub-Saharan Africa after rollout of antiretroviral therapy: a multicentre observational study. *Articles Lancet Infect Dis*, 11, 750–759. <https://doi.org/10.1016/S1473>
- Hamers, R. L., Kityo, C., Lange, J. M. A., Rinke De Wit, T. F., & Mugenyi, P. (2012). Global threat from drug resistant HIV in sub-Saharan Africa. *BMJ (Online)*, 345(7866). <https://doi.org/10.1136/bmj.e4159>
- Hans, L., BCh, M., von Allmen, N., Edelmann, A., Hofmann, J., Nilsson, A. Y., Simon, C. O., Seiverth, B., Gohl, P., & Carmona, S. (2021). Early Diagnosis of HIV-1 and HIV-2 Using Cobas HIV-1/HIV-2 Qualitative Test: A Novel Qualitative Nucleic Acid Amplification Test for Plasma, Serum, and Dried Blood Spot Specimens. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 87(5), 1187–1195. www.jaids.com
- Hebberecht, L., Vancoillie, L., Schauvliege, M., Staelens, D., Dauwe, K., Mortier, V., & Verhofstede, C. (2018). Frequency of occurrence of HIV-1 dual infection in a Belgian MSM population. *PLoS ONE*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195679>
- Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*, 18(3), 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.12.001>
- Hemelaar, J., Elangovan, R., Yun, J., Dickson-Tetteh, L., Fleminger, I., Kirtley, S., Williams, B., Gouws-Williams, E., Ghys, P. D., Abimiku, A. G., Agwale, S., Archibald, C., Avidor, B., Barbás, M. G., Barre-Sinoussi, F., Barugahare, B., Belabbes, E. H., Bertagnolio, S., Birx, D., ... Zhang, R. (2019). Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(2), 143–155. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30647-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30647-9)
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D., & Osmanov, S. (2006). Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS*, 20(16), 13–23.
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D., & Osmanov, S. (2011). Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS*, 25(5), 679–689. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328342ff93>
- Hill, L., Smith, S. R., & Karris, M. Y. (2018). Profile of bictegravir/emtricitabine/tenofovir alafenamide fixed dose combination and its potential in the treatment of HIV-1 infection: Evidence to date. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*, 10, 203–213. <https://doi.org/10.2147/HIV.S145529>
- Hines, D. M., Ding, Y., Wade, R. L., Beaubrun, A., & Cohen, J. P. (2019). Treatment adherence and persistence among HIV-1 patients newly starting treatment. *Patient Preference and Adherence*, 13, 1927–1939. <https://doi.org/10.2147/PPA.S207908>
- Hirsch, M. S., Günthard, H. F., Schapiro, J. M., Brun-Vézinet, F., Clotet, B., Hammer, S. M., Johnson, V. A., Kuritzkes, D. R., Mellors, J. W., Pillay, D., Yeni, P. G., Jacobsen, D. M., & Richman, D. D. (2008). Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 Recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clinical Infectious Diseases*, 47(2), 266–285. <https://doi.org/10.1086/589297>

- Holguín, A., López, M., Molinero, M., & Soriano, V. (2008). Performance of three commercial viral load assays, versant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, testing HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(9), 2918–2923. <https://doi.org/10.1128/JCM.02414-07>
- Holguín, A., Ramirez De Arellano, E., Rivas, P., & Soriano, V. (2006). Efficacy of Antiretroviral Therapy in Individuals Infected With HIV-1 Non-B Subtypes. *AIDS Reviews*, *8*. <http://www.iasusa.org>,
- Ibe, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Tanaka, R., Hattori, J., Fujisaki, S., Iwatani, Y., Mamiya, N., Utsumi, M., Kato, S., Hamaguchi, M., & Sugiura, W. (2010). HIV-2 CRF01_AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *54*(3), 241–247. <http://links.lww.com/QAI/A49>
- Jensen, M. A., & van 't Wout, A. B. (2003). Predicting HIV-1 Coreceptor Usage with Sequence Analysis. *AIDS Rev*, *5*, 104–112. <http://www.bio.cam.ac.uk/se->
- Jeremy Lerner, A. E. R., & Badowski, M. E. (2020). Doravirine and its potential in the treatment of hiv: An evidence-based review of the emerging data. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*, *12*, 201–210. <https://doi.org/10.2147/HIV.S184018>
- Johannessen, A., Garrido, C., Zahonero, N., Naman, E., & de Mendoza, C. (2011). HIV-1 drug resistance testing from dried blood spots collected in rural Tanzania using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(2), 260–264. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq433>
- Johnston, V., Cohen, K., Wiesner, L., Morris, L., Ledwaba, J., Fielding, K. L., Charalambous, S., Churchyard, G., Phillips, A., & Grant, A. D. (2014). Viral suppression following switch to second-line antiretroviral therapy: Associations with nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance and subtherapeutic drug concentrations prior to switch. *Journal of Infectious Diseases*, *209*(5), 711–720. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit411>
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). (2014). *Fast-track 2014*.
- Jonassen, T. Ø., Stene-Johansen, K., Berg, E. S., Hungnes, O., Lindboe, C. F., Frøland, S. S., & Grinde, B. (1997). Sequence Analysis of HIV-1 Group O from Norwegian Patients Infected in the 1960s 1. *VIROLOGY*, *231*, 43–47.
- Jordan, R., Gold, L., Cummins, C., & Hyde, C. (2002). Systematic review and meta-analysis of evidence for increasing numbers of drugs in antiretroviral combination therapy. *British Medical Journal*, *324*(7340), 757–760. <https://doi.org/10.1136/bmj.324.7340.757>
- Kaleebu, P., Kitandwe, P. K., Lutalo, T., Kigozi, A., Watera, C., Nanteza, M. B., Hughes, P., Musinguzi, J., Opio, A., Downing, R., & Mbidde, E. K. (2018). Evaluation of HIV-1 rapid tests and identification of alternative testing algorithms for use in Uganda. *BMC Infectious Diseases*, *18*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3001-4>

- Kamangu, E. N. (2018). Implication of Neighbors in the Genetic Diversity of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Democratic Republic of Congo. *ARC Journal of AIDS*, 3(1), 26–28. www.arcjournals.org
- Kamangu, E. N., Bongenia Ikolongo, B., Bulanda Ilunga, B., & Kamangu, E. N. (2017). Evolution of Subtypes of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Kinshasa over the Last 30 years: Documentary Review from 1985 to 2015. *M J HIV*, 2(1), 1–14. www.mathewsopenaccess.com
- Kamangu, E. N., Chatte, A., Susin, F., Boreux, R., & Kalala, R. L. (2015). Genetic Diversity and Antiretroviral Drug Resistance among Drug-Naïve HIV Type 1 Infected Patients attending Clinics in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *J HIV AIDS*, 1. <https://doi.org/10.16966/jha.101>
- Kang, Y., Guo, J., & Chen, Z. (2013). Closing the door to human immunodeficiency virus. In *Protein and Cell* (Vol. 4, Issue 2, pp. 86–102). Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s13238-012-2111-9>
- Kaplan, A. H., Michael, S. F., Wehbie, R. S., Knigge, M. F., Paul, D. A., Everitt, L., Kempf, D. J., Norbeck, D. W., Erickson, J. W., & Swanstrom, R. (1994). Selection of Multiple Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants that Encode Viral Proteases with Decreased Sensitivity to an Inhibitor of the Viral Protease Author. *Medical Sciences*, 91(12), 5597–5601.
- Karn, J., & Stoltzfus, C. M. (2012). Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006916>
- Kinomoto, M., Appiah-Opong, R., Brandful, J. A. M., Yokoyama, M., Nii-Trebi, N., Ugly-Kwame, E., Sato, H., Ofori-Adjei, D., Kurata, T., Oise Barre-Sinoussi, F., Sata, T., & Tokunaga, K. (2005). HIV-1 Proteases from Drug-Naïve West African Patients Are Differentially Less Susceptible to Protease Inhibitors. *AIDS*, 41, 243–251. <https://academic.oup.com/cid/article/41/2/243/531388>
- Kitchen, V. S., Skinner, C., Ariyoshi, K., Lane, E. A., Duncan, I. B., Burckhardt, J., U Burger, H., Bragman, K., Pinching, A. J., & Weber, J. N. (1995). Safety and activity of saquinavir in HIV infection. *The Lancet*, 345, 952–955.
- Kityo, C., Thompson, J., Nankya, I., Hoppe, A., Ndashimye, E., Warambwa, C., Mambule, I., van Oosterhout, J. J., Kara Wools-Kaloustian, ¶, Bertagnolio, S., Easterbrook, P. J., Mugenyi, P., Walker, A. S., Paton, N. I., Paton, N., & Lin, Y. L. (2017). HIV Drug Resistance Mutations in Non-B Subtypes After Prolonged Virological Failure on NNRTI-Based First-Line Regimens in Sub-Saharan Africa for the Europe Africa Research Network for Evaluation of Second-line Therapy (EARNEST) Trial Team. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 75(2). www.jaids.com|e45
- Kiwelu, I. E., Novitsky, V., Margolin, L., Baca, J., Manongi, R., Sam, N., Shao, J., McLane, M. F., Kapiga, S. H., & Essex, M. (2013). Frequent Intra-Subtype Recombination among HIV-1 Circulating in Tanzania. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071131>

- Korber, B., Muldoon, † M, Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S., & Bhattacharya, T. (2000). Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains. *Science*, 288, 1789–1796. www.acl.lanl.gov/
- Kosack, C. S., Page, A. L., Beelaert, G., Benson, T., Savane, A., Ng'Ang'A, A., Andre, B., Zahinda, J. P. B. N., Shanks, L., & Fransen, K. (2017). Towards more accurate HIV testing in sub-Saharan Africa: A multi-site evaluation of HIV RDTs and risk factors for false positives. *Journal of the International AIDS Society*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.7448/IAS.20.1.21345>
- Kosack, C. S., Shanks, L., Beelaert, G., Benson, T., Savane, A., Ng'Ang'A, A., Andre, B., Zahinda, J. P. B., Fransen, K., & Page, A. L. (2017). HIV misdiagnosis in sub-Saharan Africa: Performance of diagnostic algorithms at six testing sites: Performance. *Journal of the International AIDS Society*, 20(1), 1–18. <https://doi.org/10.7448/IAS.20.1.21419>
- Kosack, C. S., Shanks, L., Beelaert, G., Benson, T., Savane, A., Ng'ang'a, A., Bitá, A., Zahinda, J. P. B. N., Fransen, K., & Page, A. L. (2017). Designing HIV testing algorithms based on 2015 WHO guidelines using data from six sites in sub-Saharan Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(10), 3006–3015. <https://doi.org/10.1128/JCM.00962-17>
- Kozal, M., Aberg, J., Pialoux, G., Cahn, P., Thompson, M., Molina, J.-M., Grinsztejn, B., Diaz, R., Castagna, A., Kumar, P., Latiff, G., DeJesus, E., Gummel, M., Gartland, M., Pierce, A., Ackerman, P., Llamoso, C., & Lataillade, M. (2020). Fostemsavir in Adults with Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine*, 382(13), 1232–1243. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1902493>
- Kufa, T., Kharsany, A. B., Cawood, C., Khanyile, D., Lewis, L., Grobler, A., Chipeta, Z., Bere, A., Glenshaw, M., & Puren, A. (2017). Misdiagnosis of HIV infection during a South African community-based survey: Implications for rapid HIV testing. *Journal of the International AIDS Society*, 20(Suppl 6), 35–43. <https://doi.org/10.7448/IAS.20.7.21753>
- Kwon, E. H., Musema, G. M. A., Boelter, J., Townsend, S., Tshala-Katumbay, D., Kayembe, P. K., West, J., & Wood, C. (2020). HIV-1 subtypes and drug resistance mutations among female sex workers varied in different cities and regions of the Democratic Republic of Congo. *PLoS ONE*, 15(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228670>
- la Haya, F. I. F. (2018). *Federación Internacional Farmacéutica (FIP). Uso de medicamentos en personas mayores: El papel de la farmacia en la promoción de la adherencia.*
- Lailulo, Y., Kitenge, M., Jaffer, S., Aluko, O., & Nyasulu, P. S. (2020). Factors associated with antiretroviral treatment failure among people living with HIV on antiretroviral therapy in resource-poor settings: a systematic review and metaanalysis. *Systematic Reviews*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13643-020-01524-1>
- Lasry, A., Kalou, M. B., Young, P. R., Rurangirwa, J., Parekh, B., & Behel, S. (2019). Cost implications of HIV retesting for verification in Africa. *PLoS ONE*, 14(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218936>

- Lecher, S. L., Fonjungo, P., Ellenberg, D., Toure, C. A., Alemnji, G., Bowen, N., Basiye, F., Beukes, A., Carmona, S., de Klerk, M., Diallo, K., Dziuban, E., Kiyaga, C., N'tale, J., Naluguza, M., Ssewanyana, I., Stevens, W., Zungu, I., Bhairavabhotla, R., ... Mwasekaga, M. (2021). Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *Center for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70(21), 775–778. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1105243>
- Leelawiwat, W., Young, N. L., Chaowanachan, T., Ou, C. Y., Culnane, M., Vanprapa, N., Waranawat, N., Wasinrapee, P., Mock, P. A., Tappero, J., & McNicholl, J. M. (2009). Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: Stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. *Journal of Virological Methods*, 155(2), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.022>
- Lemey, P., Pybus, O. G., Wang, B., Saksena, N. K., Salemi, M., & Vandamme, A.-M. (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *PNAS*, 100(11), 6588–6592. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0936469100
- Lessells, R. J., Katzenstein, D. K., & de Oliveira, T. (2012). Are subtype differences important in HIV drug resistance? In *Current Opinion in Virology* (Vol. 2, Issue 5, pp. 636–643). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.08.006>
- Levy, J. A. (1993). Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 57(1), 183–289.
- Lira, R., Valdez-Salazar, H., Vazquez-Rosales, G., Rojas-Montes, O., Ruiz-Tachiquin, M., Torres-Ibarra, R., Cano-Dominguez, C., Maldonado-Rodríguez, A., Gomez, A., Muñoz, O., & Alvarez-Muñoz, M. T. (2010). Genotypic testing for HIV-1 drug resistance using dried blood samples. *Archives of Virology*, 155(7), 1117–1125. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0696-y>
- Lofgren, S. M., Morrissey, A. B., Chevallier, C. C., Malabeja, A. I., Edmonds, S., Amos, B., Sifuna, D. J., von Seidlein, L., Schimana, W., Stevens, W. S., Bartlett, J. A., & Crump, J. A. (2009). Evaluation of a dried blood spot HIV-1 RNA program for early infant diagnosis and viral load monitoring at rural and remote healthcare facilities. *AIDS*, 23(18), 2459–2466. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328331f702>
- Lundgren, J. D. M. D. [cochair], Abdel G. Babiker, Ph. D. [cochair], Fred Gordin, M. D. [cochair], Sean Emery, Ph. D. , Birgit Grund, Ph. D. , Shweta Sharma, M. S. , Anchalee Avihingsanon, M. D. , David A. Cooper, M. D. , Gerd Fätkenheuer, M. D. , Josep M. Llibre, M. D. , J., Jean-Michel Molina, M. D. , Paula Munderi, M. D. , Mauro Schechter, M. D. , Robin Wood, M. D. , Karin L. Klingman, M. D. , Simon Collins, H., Clifford Lane, M. D. , Andrew N. Phillips, Ph. D. , James D. Neaton, Ph. D., & (INSIGHT INSIGHT START Study Group). (2015). Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med*, 373(9), 795–807. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506816>
- Lusic, M., & Siliciano, R. F. (2017). Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 2, pp. 69–82). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.162>

- Makiala-Mandanda, S., le Gal, F., Ngwaka-Matsung, N., Ahuka-Mundeke, S., Onanga, R., Bivigou-Mboumba, B., Pukuta-Simbu, E., Gerber, A., Abbate, J. L., Mwamba, D., Berthet, N., Leroy, E. M., Muyembe-Tamfum, J. J., & Becquart, P. (2017). High prevalence and diversity of hepatitis viruses in suspected cases of yellow fever in the democratic Republic of Congo. *Journal of Clinical Microbiology*, *55*(5), 1299–1312. <https://doi.org/10.1128/JCM.01847-16>
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., & Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, *424*, 99–103. www.nature.com/nature
- Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L., & Kabat, D. (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nature Medicine*, *9*(11), 1398–1403. <https://doi.org/10.1038/nm946>
- Maritz, J., van Zyl, G. U., & Preiser, W. (2014). Irreproducible positive results on the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Qual test are different qualitatively from confirmed positive results. *Journal of Medical Virology*, *86*(1), 82–87. <https://doi.org/10.1002/jmv.23811>
- Markham, A. (2018). Ibalizumab: First Global Approval. *Drugs*, *78*(7), 781–785. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0907-5>
- Marston, M., Michael, D., Wringe, A., Isingo, R., Clark, B. D., Jonas, A., Mngara, J., Kalongoji, S., Mbagala, J., Chagalucha, J., Todd, J., Zaba, B., & Urassa, M. (2012). The impact of antiretroviral therapy on adult mortality in rural Tanzania. *Tropical Medicine and International Health*, *17*(8). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02924.x>
- Masciotra, S., Garrido, C., Youngpairoj, A. S., McNulty, A., Zahonero, N., Corral, A., Heneine, W., de Mendoza, C., & Gerardo García-Lerma, J. (2007). High concordance between HIV-1 drug resistance genotypes generated from plasma and dried blood spots in antiretroviral-experienced patients. *AIDS*, *21*, 2503–2511.
- Masho, S. W., Wang, C.-L., Nixon, D. E., & Masho, S. W. (2007). Review of tenofovir-emtricitabine. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, *6*, 1097–1104. www.aidsinfo.nih.gov/contentfi
- Masquelier, B., Race, E., Tamalet, C., Descamps, D., Izopet, J., Buffet-Janvresse, C., Ruffault, A., Mohammed, A. S., Cottalorda, J., Schmuck, A., Calvez, V., Dam, E., Fleury, H., & Brun-Vézinet, F. (2001). Genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 variants with insertions or deletions in the reverse transcriptase (RT): Multicenter study of patients treated with RT inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(6), 1836–1842. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1836-1842.2001>
- Mccutchan, F. E., Hegerich, P. A., Brennan, T. P., Phanuphak, P., Singharaj, P., Jugsudee, A., Berman, P. W., Gray, A. M., Fowler, A. K., & Burke, D. S. (1992). Genetic Variants of HIV-1 in Thailand. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES*, *8*(11).

- McNulty, A., Jennings, C., Bennett, D., Fitzgibbon, J., Bremer, J. W., Ussery, M., Kalish, M. L., Heneine, W., & Garcia-Lerma, J. G. (2007). Evaluation of dried blood spots for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(2), 517–521. <https://doi.org/10.1128/JCM.02016-06>
- Melikian, G. L., Rhee, S. Y., Varghese, V., Porter, D., White, K., Taylor, J., Towner, W., Troia, P., Burack, J., DeJesus, E., Robbins, G. K., Razzeca, K., Kagan, R., Liu, T. F., Jeffrey Fessel, W., Israelski, D., & Shafer, R. W. (2014). Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: Implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(1), 12–20. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt316>
- Meriki, H. D., Tufon, K. A., Anong, D. N., Atanga, P. N., Anyangwe, I. A., Cho-Ngwa, F., & Nkuo-Akenji, T. (2019). Genetic diversity and antiretroviral resistance-associated mutation profile of treated and naive HIV-1 infected patients from the Northwest and Southwest regions of Cameroon. *PLoS ONE*, *14*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225575>
- Miller, M. D., Margot, N., Lu, B., Zhong, L., Chen, S.-S., Cheng, A., & Wulfsohn, M. (2004). Genotypic and Phenotypic Predictors of the Magnitude of Response to Tenofovir Disoproxil Fumarate Treatment in Antiretroviral-Experienced Patients. *The Journal of Infectious Diseases*, *189*, 837–846.
- Mills, E. J., Celestin Bakanda, L. ;, Birungi, J., Chan, K., Ford, N., Cooper, C. L., Nachega, J. B., Dybul, M., & Hogg, R. S. (2011). Life Expectancy of Persons Receiving Combination Antiretroviral Therapy in Low-Income Countries: A Cohort Analysis From Uganda. *Annals of Internal Medicine*, *155*, 209–216. www.annals.org
- Minior, T., Douglas, M., Edgil, D., Srivastava, M., Crowley, J., Firth, J., Lapidus-Salaiz, I., Williams, J., & Lee, L. (2017). The Critical Role of Supply Chains in Preventing Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance in Low-And Middle-Income Settings. *Journal of Infectious Diseases*, *216*, S812–S815. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix403>
- Mirambeau, G. (2008). How proviral DNA is integrated into the host cell DNA and how this process can be inhibited. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *26*(SUPPL. 12), 11–16. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(08\)76567-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(08)76567-4)
- Miró, JoséM., Sued, O., Plana, M., Pumarola, T., & Gallart, T. (2004). Avances en el diagnóstico y tratamiento de la infección aguda por el VIH-1. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *22*(10), 643–659. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(04\)73164-x](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(04)73164-x)
- Moisan, A., de Oliveira, F., Pronier, C., Cappy, P., Maillard, A., & Plantier, J. C. (2020). In vivo emergence of an HIV-1/MO recombinant revealed undiagnosed HIV-1/M+O co-infection. *Clinical Microbiology and Infection*, *26*(2), 262–264. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.08.016>
- Mokili, J. L. K., Rogers, M., Carr, J. K., Simmonds, P., Bopopi, J. M., Foley, B. T., Korber, B. T., Birx, D. L., & Mccutchan, F. E. (2002). Sequence Note Identification of a Novel Clade of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Democratic Republic of Congo. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES*, *18*(11), 817–823. <http://hiv-web.lanl.gov/>

- Monleau, M., Butel, C., Delaporte, E., Boillot, F., & Peeters, M. (2010). Effect of storage conditions of dried plasma and blood spots on HIV-1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance genotyping. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1562–1566. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq205>
- Mor, O., Mileguir, F., Michaeli, M., Levy, I., & Mendelson, E. (2014). Evaluation of the bio-rad Geenius HIV 1/2 assay as an alternative to the INNO-LIA HIV 1/2 assay for confirmation of HIV infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2677–2679. <https://doi.org/10.1128/JCM.01184-14>
- Mossong, J., Grapsa, E., Tanser, F., Bärnighausen, T., & Newell, M. L. (2013). Modelling HIV incidence and survival from agespecific seroprevalence after antiretroviral treatment scale-up in rural South Africa. *AIDS*, 27(15), 2471–2479. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000432475.14992.da>
- Mourez, T., Simon, F., & Plantiera, J. C. (2013). Non-M variants of human immunodeficiency virus type. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 448–461. <https://doi.org/10.1128/CMR.00012-13>
- Mullis, C. E., Laeyendecker, O., Reynolds, S. J., Ocamo, P., Quinn, J., Boaz, I., Gray, R. H., Kirk, G. D., Thomas, D. L., Quinn, T. C., & Stabinski, L. (2013). High frequency of false-positive hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assay in Rakai, Uganda. *Clinical Infectious Diseases*, 57(12), 1747–1750. <https://doi.org/10.1093/cid/cit602>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2013). *Medical Microbiology*. Elsevier Mosby.
- Muwonga, J., Edidi, S., Butel, C., Vidal, N., Monleau, M., Okenge, A., Lambert Mandjo, J., Mukumbi, H., Jacques Muyembe, J., Mbayo, F., Kayembe Nzongola, D., Delaporte, E., Boillot, F., & Peeters, M. (2011). Resistance to Antiretroviral Drugs in Treated and Drug-Naive Patients in the Democratic Republic of Congo. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 57(1), 27–33. <http://www.hivfrenchresistance.org/>
- Nachega, J. B., Marconi, V. C., van Zyl, G. U., Gardner, E. M., Preiser, W., Hong, S. Y., Mills, E. J., & Gross, R. (2011). HIV Treatment Adherence, Drug Resistance, Virologic Failure: Evolving Concepts HHS Public Access. *Infect Disord Drug Targets*, 11(2), 167–174.
- Nash, D., Yotebieng, M., & Sohn, A. H. (2018). Treating all people living with HIV in sub-Saharan Africa: a new era calling for new approaches. *Journal of Virus Eradication*, 4, 1–4.
- Ngowi, B. J., Mfinanga, S. G., Bruun, J. N., & Morkve, O. (2009). Immunohaematological reference values in human immunodeficiency virus-negative adolescent and adults in rural northern Tanzania. *BMC Infectious Diseases*, 9, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-1>
- Nguyen, B. Y. T., Isaacs, R. D., Teppler, H., Leavitt, R. Y., Sklar, P., Iwamoto, M., Wenning, L. A., Miller, M. D., Chen, J., Kemp, R., Xu, W., Fromtling, R. A., Vacca, J. P., Young, S. D., Rowley, M., Lower, M. W., Gottesdiener, K. M., & Hazuda, D. J. (2011). Raltegravir: The first HIV-1 integrase strand transfer inhibitor in the HIV armamentarium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1222(1), 83–89. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05972.x>

- Nii-Trebi, N. I., Brandful, J. A. M., Ibe, S., Sugiura, W., Barnor, J. S., Bampoh, P. O., Yamaoka, S., Matano, T., Yoshimura, K., Ishikawa, K., & Ampofo, W. K. (2017). Dynamic HIV-1 genetic recombination and genotypic drug resistance among treatment-experienced adults in northern Ghana. *Journal of Medical Microbiology*, *66*(11), 1663–1672. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000621>
- Njouom, R., Ngono, L., Mekinda-Gometi, D. D., Ndé, C. K., Sadeuh-Mba, S. A., Vernet, M. A., Tchendjou, P., & Vernet, G. (2017). Evaluation of the performances of twelve rapid diagnostic tests for diagnosis of HIV infection in Yaounde, Cameroon. *Journal of Virological Methods*, *243*, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.02.008>
- Nsanzimana, S., Kanters, C. S., Chan, K., Forrest MPH, J. I., Mills, E. J., Mills, E. J., Nsanzimana, S., Remera, E., Kanters, S., Chan, K., Forrest, J. I., Ford, N., Condo, J., & Binagwaho, A. (2015). Life expectancy among HIV-positive patients in Rwanda: a retrospective observational cohort study. *The Lancet Glob Health*, *3*, 169–177. www.thelancet.com/lancetgh
- Ntambwe Erick, K., Zakayi, K., Lelo Georges, M., Lunganza Richard, K., Kahunu Gauthier, M., Author, C., & NTAMBWE Erick, K. (2013). Genetic Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Democratic Republic of Congo: a review of available data. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*, *5*(5).
- Ochola, J., Imbach, M., Eller, L. A., de Souza, M., Nwoga, C., Otieno, J. D., Otieno, L., Rono, E., Kamau, E., Crowell, T. A., Owuoth, J. K., Polyak, C. S., & Sing'oei, V. (2021). False reactive HIV-1 diagnostic test results in an individual from Kenya on multiple testing platforms-A case report. *IDCases*, *23*. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e01035>
- Oster, A. M., Switzer, W. M., Hernandez, A. L., Saduvala, N., Wertheim, J. O., Nwangwu-Ike, N., Ocfemia, M. C., Campbell, E., & Hall, H. I. (2017). Increasing HIV-1 subtype diversity in seven states, United States, 2006–2013. *Annals of Epidemiology*, *27*(4), 244–251.e1. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2017.02.002>
- Ostler, M. W., Porter, J. H., & Buxton, O. M. (2014). Dried blood spot collection of health biomarkers to maximize participation in population studies. *Journal of Visualized Experiments*, *83*. <https://doi.org/10.3791/50973>
- Parianti, J. J., Ragland, K., Lucht, F., de La Arnaud, B., Dargàre, S., Yazdanpanah, Y., Dutheil, J. J., Perré, P., Verdón, R., & Bangsberg, D. R. (2010). Average adherence to boosted protease inhibitor therapy, rather than the pattern of missed doses, as a predictor of HIV RNA replication. *Clinical Infectious Diseases*, *50*(8), 1192–1197. <https://doi.org/10.1086/651419>
- Peeters, M., Liegeois, F., Torimiro, N., Bourgeois, A., Mpoudi, E., Vergne, L., Saman, E., Delaporte, E., & Saragosti, S. (1999). Characterization of a Highly Replicative Intergroup M/O Human Immunodeficiency Virus Type 1 Recombinant Isolated from a Cameroonian Patient. *JOURNAL OF VIROLOGY*.
- PEPFAR. (2019). *U.S. President's Emergency Plan for AIDS Relief (PEPFAR). Democratic Republic of the Congo Country Operational Plan (COP) 2019 Strategic Direction Summary*.

- Pérez Molina, J. A., Martínez, E., González García Fernando Lozano, J., Aguirrebengoa, K., Ramón Arribas, J., Berenguer, J., Ramón Blanco Vicente Boix Adriá Curran, J., Domingo, P., Dueñas, C., Estrada Hospital Clínico San Carlos IdISSC Madrid Pepa Galindo, V., García, F., Gutiérrez, F., Hernández, M., José Antonio Iribarren, A., Imaz, A., Knobel, H., Losa, J. E., Mariño, A., Miralles, C., & Miró, J. M. (2019). *Documento de consenso de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2019)*.
- Perry, C. M., Faulds, D., Back, D., & Heald, A. (1997). Lamivudine: A Review of its Antiviral Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in the Management of HIV Infection. *Drugs*, 53(4), 667–680.
- Petropoulos, C. J., Parkin, N. T., Limoli, K. L., Lie, Y. S., Wrin, T., Huang, W., Tian, H., Smith, D., Winslow, G. A., Capon, D. J., & Whitcomb, J. M. (2000). *A Novel Phenotypic Drug Susceptibility Assay for Human Immunodeficiency Virus Type 1* (Vol. 44, Issue 4). <http://aac.asm.org/>
- Phanuphak, N., & Gulick, R. M. (2020). HIV treatment and prevention 2019: Current standards of care. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 15(1), 4–12. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000588>
- Phillips, A., Shroufi, A., Vojnov, L., Cohn, J., Roberts, T., Ellman, T., Bonner, K., Rousseau, C., Garnett, G., Cambiano, V., Nakagawa, F., Ford, D., Bansi-Matharu, L., Miners, A., Lundgren, J. D., Eaton, J. W., Parkes-Ratanshi, R., Katz, Z., Maman, D., ... Revill, P. (2015). Sustainable HIV treatment in Africa through viral-load-informed differentiated care. *Nature*, 528(7580), S68–S76. <https://doi.org/10.1038/nature16046>
- Piantadosi, A., Chohan, B., Chohan, V., McClelland, R. S., & Overbaugh, J. (2007). Chronic HIV-1 infection frequently fails to protect against superinfection. *PLoS Pathogens*, 3(11), 1745–1760. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030177>
- Pineda-Peña, A. C., Faria, N. R., Imbrechts, S., Libin, P., Abecasis, A. B., Deforche, K., Gómez-López, A., Camacho, R. J., de Oliveira, T., & Vandamme, A. M. (2013). Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: Performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 337–348. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.032>
- Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., de Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D. L., & Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, 15(8), 871–872. <https://doi.org/10.1038/nm.2016>
- Plate, D. K., & Wiktor, S. Z. (2007). Evaluation and implementation of rapid HIV tests: The experience in 11 African countries. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 23(12), 1491–1498. <https://doi.org/10.1089/aid.2007.0020>
- PNMLS. (2018). Programme National Multisectoriel de Lutte contre le Sida (RDCongo). Plan Stratégique National de la riposte au VIH/Sida 2018-2021 – PNMLS. In [http://www.pnmls.cd/doc/PSN 2018 - 2021.pdf](http://www.pnmls.cd/doc/PSN%202018%20-%202021.pdf).

- Pollard, R. B. (2000). Didanosine once daily: potential for expanded use. *AIDS*, 41(16), 2421–2428. <https://journals.lww.com/aidsonline>
- Quercia, R., Perno, C.-F., Koteff, J., Moore, K., McCoig, C., St Clair, M., & Kuritzkes, D. (2018). Twenty-Five Years of Lamivudine: Current and Future Use for the Treatment of HIV-1 Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 78(2), 125–135. www.jaids.com
- Rai, M. A., Pannek, S., & Fichtenbaum, C. J. (2018). Emerging reverse transcriptase inhibitors for HIV-1 infection. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 23(2), 149–157. <https://doi.org/10.1080/14728214.2018.1474202>
- Rathbun, R. C., Lockhart, S. M., Miller, M. M., & Liedtke, M. D. (2014). Dolutegravir, a Second-Generation Integrase Inhibitor for the Treatment of HIV-1 Infection. *Annals of Pharmacotherapy*, 48(3), 395–403. <https://doi.org/10.1177/1060028013513558>
- Reniers, G., Slaymaker, E., Nakiyingi-Miiró, J., Nyamukapa, C., Crampin, A. C., Herbst, K., Urassa, M., Otieno, F., Gregson, S., Sewe, M., Michael, D., Lutalo, T., Hosegood, V., Kasamba, I., Price, A., Nabukalu, D., Mclean, E., & Zaba, B. (2014). Mortality trends in the era of antiretroviral therapy: Evidence from the network for analysing longitudinal population based HIV/AIDS data on Africa (ALPHA). *AIDS*, 28, S533–S542. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000496>
- Requejo, H. (2006). Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Saúde Pública*, 40(2), 331–345.
- Requena, S., Caballero, E., Lozano, A. B., Ríos-Villegas, M. J., Benito, R., Rojo, S., Cabezas, T., Macià, M. D., Nieto, M. D. C., Soriano, V., & de Mendoza, C. (2019). Treatment outcome in dually HIV-1 and HIV-2 coinfecting patients living in Spain. *AIDS*, 33(14), 2167–2172. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002338>
- Rhee, S. Y., Blanco, J. L., Jordan, M. R., Taylor, J., Lemey, P., Varghese, V., Hamers, R. L., Bertagnolio, S., de Wit, T. F. R., Aghokeng, A. F., Albert, J., Avi, R., Avila-Rios, S., Bessong, P. O., Brooks, J. I., Boucher, C. A. B., Brumme, Z. L., Busch, M. P., Bussmann, H., ... Shafer, R. W. (2015). Geographic and Temporal Trends in the Molecular Epidemiology and Genetic Mechanisms of Transmitted HIV-1 Drug Resistance: An Individual-Patient- and Sequence-Level Meta-Analysis. *PLoS Medicine*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001810>
- Rhee, S. Y., Gonzales, M. J., Kantor, R., Betts, B. J., Ravela, J., & Shafer, R. W. (2003). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 298–303. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg100>
- Rhee, S. Y., Taylor, J., Fessel, W. J., Kaufman, D., Towner, W., Troia, P., Ruane, P., Hellinger, J., Shirvani, V., Zolopa, A., & Shafer, R. W. (2010). HIV-1 protease mutations and protease inhibitor cross-resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4253–4261. <https://doi.org/10.1128/AAC.00574-10>
- Ribera, E., Tuset, M., Martín, M., & del Cacho, E. (2011). Characteristics of antiretroviral drugs. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(5), 362–391. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.02.004>

- Rivas, P., Holguín, Á., Ramírez de Arellano, E., Muñoz-Almagro, C., Delgado, R., Ortiz de Lejarazu, R., & Soriano, V. (2006). Tratamiento antirretroviral según tipos y subtipos del virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 24, 29–33.
- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F., Hahn, B. H., Kalish, M. L., Kuiken, C., Learn, G. H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P. M., Wolinsky, S., & Korber, B. (2000). HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science*, 288(5463), 55–55. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.55d>
- Rodgers, M. A., Vallari, A. S., Harris, B., Yamaguchi, J., Holzmayer, V., Forberg, K., Berg, M. G., Kenmenge, J., Ngansop, C., Awazi, B., Mbanya, D., Kaptue, L., Brennan, C., Cloherty, G., & Ndembu, N. (2017). Identification of rare HIV-1 Group N, HBV AE, and HTLV-3 strains in rural South Cameroon. *Virology*, 504, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.01.008>
- Rosa Flieller, D., Susana Cabrera Revisión, D., Medina, J., & Susana Cabrera, D. (2019). *Virus de inmunodeficiencia humana y resistencia a antirretrovirales Virus de inmunodeficiencia humana y resistencia a antirretrovirales. REVISIÓN.*
- Ross, J., Ribakare, M., Remera, E., Murenzi, G., Munyaneza, A., Hoover, D. R., Shi, Q., Nsanzimana, S., Yotebieng, M., Nash, D., & Anastos, K. (2020). High levels of viral load monitoring and viral suppression under Treat All in Rwanda—a cross-sectional study. *Journal of the International AIDS Society*, 23, 1–6. <https://doi.org/10.1002/jia2.25543/full>
- Rousseau, C. M., Learn, G. H., Bhattacharya, T., Nickle, D. C., Heckerman, D., Chetty, S., Brander, C., Goulder, P. J. R., Walker, B. D., Kiepiela, P., Korber, B. T., & Mullins, J. I. (2007). Extensive Intrasubtype Recombination in South African Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Infections. *Journal of Virology*, 81(9), 4492–4500. <https://doi.org/10.1128/jvi.02050-06>
- Rubio-Garrido, M., Ndarabu, A., Reina, G., Barquín, D., Fernández-Alonso, M., Carlos, S., & Holguín, Á. (2019). Utility Of POC Xpert HIV-1 Tests For Detection-Quantification Of Complex HIV Recombinants Using Dried Blood Spots From Kinshasa, D. R. Congo. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41963-y>
- Rubio-Garrido, M., Reina, G., Ndarabu, A., Rodríguez-Galet, A., Valadés-Alcaraz, A., Barquin, D., Carlos, S., & Holguín, A. F. (2021). High drug resistance levels could compromise the control of HIV infection in paediatric and adolescent population in Kinshasa, the Democratic Republic of Congo. *PLoS ONE*, 16(4 April), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248835>
- Rutstein, S. E., Golin, C. E., Wheeler, S. B., Kamwendo, D., Hosseinipour, M. C., Weinberger, M., Miller, W. C., Biddle, A. K., Soko, A., Mkandawire, M., Mwenda, R., Sarr, A., Gupta, S., & Mataya, R. (2016). On the front line of HIV virological monitoring: Barriers and facilitators from a provider perspective in resource-limited settings. *AIDS Care - Psychological and Socio-Medical Aspects of AIDS/HIV*, 28(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/09540121.2015.1058896>

- Rutstein, S. E., Hosseinipour, M. C., Kamwendo, D., Soko, A., Mkandawire, M., Biddle, A. K., Miller, W. C., Weinberger, M., Wheeler, S. B., Sarr, A., Gupta, S., Chimbwandira, F., Mwenda, R., Kamiza, S., Hoffman, I., & Mataya, R. (2015). Dried blood spots for viral load monitoring in malawi: Feasible and effective. *PLoS ONE*, *10*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124748>
- Saag, M. S., Benson, C. A., Gandhi, R. T., Hoy, J. F., Landovitz, R. J., Mugavero, M. J., Sax, P. E., Smith, D. M., Thompson, M. A., Buchbinder, S. P., del Rio, C., Eron, J. J., Fätkenheuer, G., Günthard, H. F., Molina, J. M., Jacobsen, D. M., & Volberding, P. A. (2018). Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults: 2018 recommendations of the international antiviral society-USA panel. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *320*(4), 379–396. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.8431>
- Sallam, M., En, G., Şahin, Ö., Ingman, M., Widell, A., Esbjörnsson, J., & Medstrand, P. (2017). Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 transmission in the Middle East and North Africa. *Heliyon*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017>
- Schlub, T. E., Smyth, R. P., Grimm, A. J., Mak, J., & Davenport, M. P. (2010). Accurately measuring recombination between closely related HIV-1 genomes. *PLoS Computational Biology*, *6*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000766>
- Schmitz, M. E., Agolory, S., Junghae, M., Broyles, L. N., Kimeu, M., Ombayo, J., Umuro, M., Mukui, I., Alwenya, K., Baraza, M., Ndiege, K., Mwalili, S., Rivadeneira, E., Ng, L., Yang, C., & Zeh, C. (2016). Field Evaluation of Dried Blood Spots for HIV-1 Viral Load Monitoring in Adults and Children Receiving Antiretroviral Treatment in Kenya: Implications for Scale-up in Resource-Limited Settings. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *74*(4), 399–406. <http://links.lww.com/QAI/A963>,
- Schwartz, O., Chal, V. M., Danos, O., & Heard, J.-M. (1995). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Increases the Efficiency of Reverse Transcription in the Infected Cell. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 69, Issue 7).
- Seitz, R. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *43*(3), 203–222. <https://doi.org/10.1159/000445852>
- Sengupta, S., & Siliciano, R. F. (2018). Targeting the Latent Reservoir for HIV-1. *Immunity*, *48*(5), 872–895. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.030>
- Seremba, E., Ocama, P., Opio, C. K., Thomas, D. L., Yuan, H. J., Attar, N., & Lee, W. M. (2010). Poor performance of hepatitis C antibody tests in hospital patients in Uganda. *Journal of Medical Virology*, *82*(8), 1371–1378. <https://doi.org/10.1002/jmv.21817>
- Serhir, B., Desjardins, C., Doualla-Bell, F., Simard, M., Tremblay, C., & Longtin, J. (2019). Evaluation of the bio-rad geenius HIV 1/2 assay as part of a confirmatory HIV testing strategy for Quebec, Canada: Comparison with western blot and inno-lia assays. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(6), 1–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.01398-18>
- Shanks, L., Siddiqui, M. R., Kliescikova, J., Pearce, N., Ariti, C., Muluneh, L., Pirou, E., Ritmeijer, K., Masiga, J., & Abebe, A. (2015). Evaluation of HIV testing algorithms in Ethiopia: The role

- of the tie-breaker algorithm and weakly reacting test lines in contributing to a high rate of false positive HIV diagnoses. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0769-3>
- Sharma, A. L., Singh, T. R., Devi, K. R., & Singh, L. S. (2017). Molecular epidemiology of HIV-1 among the HIV infected people of Manipur, Northeastern India: Emergence of unique recombinant forms. *Journal of Medical Virology*, 89(6), 989–999. <https://doi.org/10.1002/jmv.24738>
- Sharma, S., Schlusser, K. E., de La Torre, P., Tambussi, G., Draenert, R., Pinto, A. N., Metcalf, J. A., Neaton, J. D., & Laeyendecker, O. (2019). The benefit of immediate compared with deferred antiretroviral therapy on CD4+ cell count recovery in early HIV infection. *AIDS*, 33(8), 1335–1344. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002219>
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., & Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 418(6898), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nature00969>
- Shimura, K., & Kodama, E. N. (2009). Elvitegravir: A new HIV integrase inhibitor. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 20(2), 79–85. <https://doi.org/10.3851/IMP1397>
- Shindano, T. A., Kabinda, J. M., Mitashi, P., & Horsmans, Y. (2018). Hepatitis B virus infection in the Democratic Republic of Congo: a systematic review of prevalence studies (2000–2016). *Journal of Public Health (Germany)*, 26(5), 595–603. <https://doi.org/10.1007/s10389-018-0894-8>
- Siedner, M. J., Moorhouse, M. A., Simmons, B., de Oliveira, T., Lessells, R., Giandhari, J., Kemp, S. A., Chimukangara, B., Akpomiemie, G., Serenata, C. M., Venter, W. D. F., Hill, A., & Gupta, R. K. (2020). Reduced efficacy of HIV-1 integrase inhibitors in patients with drug resistance mutations in reverse transcriptase. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19801-x>
- Sigaloff, K. C. E., Hamers, R. L., Wallis, C. L., Kityo, C., Siwale, M., Ive, P., Botes, M. E., Mandaliya, K., Wellington, M., Osibogun, A., Stevens, W. S., van Vugt, M., & Rinke De Wit, T. F. (2012). Second-line antiretroviral treatment successfully resuppresses drug-resistant HIV-1 after first-line failure: Prospective cohort in sub-Saharan Africa. *Journal of Infectious Diseases*, 205(11), 1739–1744. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis261>
- Simon, F., Mauciere, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barre-Sinoussi, F., & Brun-Vezinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *NATURE MEDICINE*, 4, 1032–1037.
- Singh, M. P., Majumdar, M., Budhathoki, B., Goyal, K., Chawla, Y., & Ratho, R. K. (2014). Assessment of dried blood samples as an alternative less invasive method for detection of

- Hepatitis E virus marker in an outbreak setting. *Journal of Medical Virology*, 86(4), 713–719. <https://doi.org/10.1002/jmv.23874>
- Smith, D. M., Richman, D. D., & Little, S. J. (2005). HIV Superinfection. *The Journal of Infectious Diseases*, 192, 438–444. <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/192/3/438/834693>
- Smyth, R. P., Davenport, M. P., & Mak, J. (2012). The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Research*, 169(2), 415–429. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.015>
- Soulier, A., Poiteau, L., Rosa, I., Hézode, C., Roudot-Thoraval, F., Pawlotsky, J. M., & Chevaliez, S. (2016). Dried blood spots: A tool to ensure broad access to hepatitis C screening, diagnosis, and treatment monitoring. *Journal of Infectious Diseases*, 213(7), 1087–1095. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv423>
- Stadeli, K. M., & Richman, D. D. (2013). Rates of emergence of HIV drug resistance in resource-limited settings: A systematic review. *Antiviral Therapy*, 18(1), 115–123. <https://doi.org/10.3851/IMP2437>
- Steege, K., Luchters, S., Demecheleer, E., Dauwe, K., Mandaliya, K., Jaoko, W., Plum, J., Temmerman, M., & Verhofstede, C. (2007). Feasibility of detecting human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in DNA extracted from whole blood or dried blood spots. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10), 3342–3351. <https://doi.org/10.1128/JCM.00814-07>
- Stefic, K., Guinard, J., Peytavin, G., Saboni, L., Sommen, C., Sauvage, C., Lot, F., Laperche, S., Velter, A., & Barin, F. (2020). Screening for human immunodeficiency virus infection by use of a fourth-generation antigen/antibody assay and dried blood spots: In-depth analysis of sensitivity and performance assessment in a cross-sectional study. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(1), 1–10. <https://doi.org/10.1128/JCM.01645-19>
- Stirrup, O. T., Asboe, D., Pozniak, A., Sabin, C. A., Gilson, R., Mackie, N. E., Tostevin, A., Hill, T., Dunn, D. T., Chadwick, D., Churchill, D., Clark, D., Collins, S., Delpech, V., Douthwaite, S., Fearnhill, E., Porter, K., Fraser, C., Geretti, A. M., ... Gatford, C. (2020). Continuation of emtricitabine/lamivudine within combination antiretroviral therapy following detection of the M184V/I HIV-1 resistance mutation. *HIV Medicine*, 21(5), 309–321. <https://doi.org/10.1111/hiv.12829>
- Su, X., Carlson, B. F., Wang, X., Li, X., Zhang, Y., Montgomery, J. L. P., Ding, Y., Wagner, A. L., Gillespie, B., & Boulton, M. L. (2018). Dried blood spots: An evaluation of utility in the field. *Journal of Infection and Public Health*, 11(3), 373–376. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.014>
- Swindells, S., Andrade-Villanueva, J.-F., Richmond, G. J., Rizzardini, G., Baumgarten, A., Masiá, M., Latiff, G., Pokrovsky, V., Bredeek, F., Smith, G., Cahn, P., Kim, Y.-S., Ford, S. L., Talarico, C. L., Patel, P., Chounta, V., Crauwels, H., Parys, W., Vanveggel, S., ... Spreen, W. R. (2020). Long-Acting Cabotegravir and Rilpivirine for Maintenance of HIV-1 Suppression. *New England Journal of Medicine*, 382(12), 1112–1123. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1904398>

- Tada, K., Kobayashi, M., Takiuchi, Y., Iwai, F., Sakamoto, T., Nagata, K., Shinohara, M., Ito, K., Shirakawa, K., Hishizawa, M., Shindo, K., Kadowaki, N., Hirota, K., Yamamoto, J., Iwai, S., Sasanuma, H., Takeda, S., & Takaori-Kondo, A. (2015). Abacavir, an anti-HIV-1 drug, targets TDP1-deficient adult T cell leukemia. *Science Advances*, 1(3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400203>
- Tagny, C. T., Bissim, M., Djeumen, R., Ngo Sack, F., Angandji, P., Ndoumba, A., Kouanfack, C., Eno, L., Mbanya, D., Murphy, E. L., & Laperche, S. (2020). The use of the Geenius™ HIV-1/2 Rapid confirmatory test for the enrolment of patients and blood donors in the WHO Universal Test and Treat Strategy in Cameroon, Africa. *Vox Sanguinis*, 115(8), 686–694. <https://doi.org/10.1111/vox.12942>
- Takehisa, J., Kraus, M. H., Ayoub, A., Bailes, E., van Heuverswyn, F., Decker, J. M., Li, Y., Rudicell, R. S., Learn, G. H., Neel, C., Ngole, E. M., Shaw, G. M., Peeters, M., Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2009). Origin and Biology of Simian Immunodeficiency Virus in Wild-Living Western Gorillas. *Journal of Virology*, 83(4), 1635–1648. <https://doi.org/10.1128/jvi.02311-08>
- Takehisa, J., Zekeng, L. O., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Mboudjeka, I., Harada, Y., Miura, T., Kaptué, L., & Hayami, M. (1999). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Intergroup (M/O) Recombination in Cameroon. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 73(8), 6810–6820.
- Tan, W. S., Chow, E. P. F., Fairley, C. K., Chen, M. Y., Bradshaw, C. S., & Read, T. R. H. (2016). Sensitivity of HIV rapid tests compared with fourth-generation enzyme immunoassays or HIV RNA tests. *Aids*, 30(12), 1951–1960. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001134>
- Tang, M. W., Rhee, S. Y., Bertagnolio, S., Ford, N., Holmes, S., Sigaloff, K. C., Hamers, R. L., de Wit, T. F. R., Fleury, H. J., Kanki, P. J., Ruxrungtham, K., Hawkins, C. A., Wallis, C. L., Stevens, W., van Zyl, G. U., Manosuthi, W., Hosseinipour, M. C., Ngo-Giang-Huong, N., Belec, L., ... Shafer, R. W. (2013). Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations associated with first-line stavudine-containing antiretroviral therapy: Programmatic implications for countries phasing out stavudine. *Journal of Infectious Diseases*, 207(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1093/infdis/jit114>
- Tang, M. W., & Shafer, R. W. (2012). HIV-1 Antiretroviral Resistance Scientific Principles and Clinical Applications. *Drugs*, 72(9), 1–25.
- Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., Mccutchan, F. E., & Hammer, S. M. (2008). The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *The New England Journal of Medicine*, 358(15), 1590–1602. www.nejm.org
- Thierry, E., Deprez, E., & Delelis, O. (2017). Different pathways leading to integrase inhibitors resistance. *Frontiers in Microbiology*, 7(2165), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02165>
- Thomas, M., Gilbert, P., Rambaut, A., Wlasiuk, G., Spira, T. J., Pitchenik, A. E., & Worobey, M. (2007). The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *PNAS*, 104(47), 18566–18570. www.pnas.org/cgi/content/full/

- Thomson, M. M., Casado, G., Posada, D., Sierra, M., & Nájera, R. (2005). Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba. *AIDS*, *19*(11), 1155–1163. <http://journals.lww.com/aidsonline>
- Thornhill, J., & Orkin, C. (2021). Long-acting injectable HIV therapies: The next frontier. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *34*(1), 8–15. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000701>
- Tola, M., Habib, R. O., Sylvia, A., Crowell, T. A., Rebecca, N. G., Charurat, M. E., Dakum, P., & Ndembu, N. (2021). Field evaluation of HIV-1 viral load monitoring in adults and children receiving antiretroviral treatment in Nigeria by dried blood spot testing with RealTime HIV-1 on m2000. *Journal of Clinical Virology*, *135*. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104694>
- Toro, C., & Amor Vicente Soriano, A. (2007). Diagnóstico de las infecciones por subtipos no B del VIH-1 y por VIH-2 Diagnosis of HIV-1 non-B subtypes and HIV-2. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, *26*, 66–70. <http://www.elsevier.es>
- Toro, C., Rodés, B., Aguilera, A., Caballero, E., Benito, R., Bassani, S., Rodríguez, C., Tuset, C., Ortiz de Lejarazu, R., Eirós, J., García, J., Calderón, E., Capote, F. J., Vallejo, A., Gutiérrez, M., Soriano Grupo Español para el Estudio del VIH-, V., Htlv-i, del, Caballero Hospital Vall, E., Aguilera, A., ... Castro, A. (2004). Infecciones por VIH-2 y HTLV-I/II en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, *22*(3), 177–182.
- Trezza, C., Ford, S. L., Spreen, W., Pan, R., & Piscitelli, S. (2015). Formulation and pharmacology of long-acting cabotegravir. *Current Opinion in HIV and AIDS*, *10*(4), 239–245. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000168>
- Tuaillon, E., Gueudin, M., Lemée, V., Gueit, I., Roques, P., Corrigan, G. E., Plantier, J.-C., xois Simon, F., & Braun, J. (2004). Phenotypic Susceptibility to Nonnucleoside Inhibitors of Virion-Associated Reverse Transcriptase From Different HIV Types and Groups. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *37*(5), 1543–1549. <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/CRFs/CRFs.html>
- Tuaillon, E., Kania, D., Pisoni, A., Bollere, K., Taieb, F., Ontsira Ngoyi, E. N., Schaub, R., Plantier, J. C., Makinson, A., & van de Perre, P. (2020). Dried Blood Spot Tests for the Diagnosis and Therapeutic Monitoring of HIV and Viral Hepatitis B and C. *Frontiers in Microbiology*, *11*(March), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00373>
- Tumiotto, C., Bellecave, P., Recordon-Pinson, P., Groppi, A., Nikolski, M., & Fleury, H. (2018). Diversity of HIV-1 in Aquitaine, Southwestern France, 2012-2016. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *34*(5), 471–473. <https://doi.org/10.1089/aid.2017.0298>
- UNAIDS. (2020). *UNAIDS 2020*.
- UNAIDS. (2021). *CONFRONTING INEQUALITIES Lessons for pandemic responses from 40 years of AIDS*.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). (2007). *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test*. <https://www.fda.gov/media/73824/download>.

- Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., Mbanya, D., Kaptue, L., Ndembi, N., Gurtler, L., Devare, S., & Brennan, C. A. (2011). Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon. *Journal of Virology*, *85*(3), 1403–1407. <https://doi.org/10.1128/jvi.02005-10>
- van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B. F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Delaporte, E., Hahn, B. H., & Peeters, M. (2006). Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*, *444*(7116), 164. <https://doi.org/10.1038/444164a>
- van Wesenbeeck, L., Rondelez, E., Feyaerts, M., Verheyen, A., van der Borght, K., Smits, V., Cleybergh, C., de Wolf, H., van Baelen, K., & Stuyver, L. J. (2011). Cross-resistance profile determination of two second-generation HIV-1 integrase inhibitors using a panel of recombinant viruses derived from raltegravir-treated clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(1), 321–325. <https://doi.org/10.1128/AAC.01733-09>
- Vanegas-otálvaro, D., Acevedo-sáenz, L., Javier Díaz-castrillón, F., & Andrea Velilla-hernández, P. (2014). Resistencia a antirretrovirales: bases moleculares e implicaciones farmacológicas Resistance to antiretrovirals: molecular bases and pharmacological implications. *Rev CES Med*, *28*(1), 91–106.
- Vergne, L., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngole, E., Mougnotou, R., Mbuagbaw, J., Liegeois, F., Laurent, C., Butel, C., Zekeng, L., Delaporte, E., & Peeters, M. (2003). Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02_AG variant and disease stage. *Virology*, *310*(2), 254–266. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00167-3](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00167-3)
- Vessièrre, A., Rousset, D., Kfutwah, A., Leoz, M., Depatureaux, A., xois Simon, F., & Plantier, J.-C. (2010). Diagnosis and Monitoring of HIV-1 Group O-Infected Patients in Cameroun. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *53*(1), 107–110. <http://www>.
- Vidal, N., Frange, P., Chaix, M. L., Mulanga, C., Lepira, F., Bazepeo, S. E., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Delaporte, E., & Peeters, M. (2008). Characterization of an old complex circulating recombinant form, CRF27_cpx, originating from the Democratic Republic of Congo (DRC) and circulating in France. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *24*(2), 315–321. <https://doi.org/10.1089/aid.2007.0241>
- Vidal, N., Mulanga, C., Edidi Bazepeo, S., Kasali Mwamba, J., Tshimpaka, J., Kashi, M., Mama, N., Valéa, D., Delaporte, E., Lepira, F., & Peeters, M. (2006). Sequence Note HIV Type 1 pol Gene Diversity and Antiretroviral Drug Resistance Mutations in the Democratic Republic of Congo (DRC). *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES*, *22*(2), 202–206. <http://hivdb6.stanford.edu/>
- Vidal, N., Peeters, M., Mulanga-kabeya, C., Nzilambi, N., Robertson, D., Ilunga, W., Sema, H., Tshimanga, K., Bongo, B., Delaporte, E., Retrovirus, L., de Chauliac, G., Sida, P., & Bonzola, pital. (2000). Unprecedented Degree of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Group M Genetic Diversity in the Democratic Republic of Congo Suggests that the HIV-1

- Pandemic Originated in Central Africa. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 74(22), 10498–10507. <http://igs-server.cnrs-mrs.fr>
- Villabona-Arenas, C. J., Domyeum, J., Mouacha, F., Butel, C., Delaporte, E., Peeters, M., Mpoudi-Ngole, E., & Aghokeng, A. F. (2015). HIV-1 group O infection in Cameroon from 2006 to 2013: Prevalence, genetic diversity, evolution and public health challenges. *Infection, Genetics and Evolution*, 36, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.006>
- Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D., & Charpentier, C. (2016). Hiv-2 molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 46, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.010>
- Volz, E. M., le Vu, S., Ratmann, O., Tostevin, A., Dunn, D., Orkin, C., O’Shea, S., Delpech, V., Brown, A., Gill, N., & Fraser, C. (2018). Molecular Epidemiology of HIV-1 Subtype B Reveals Heterogeneous Transmission Risk: Implications for Intervention and Control. *Journal of Infectious Diseases*, 217(10), 1522–1529. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy044>
- Wang, Y., Xing, H., Liao, L., Wang, Z., Su, B., Zhao, Q., Feng, Y., Ma, P., Liu, J., Wu, J., Ruan, Y., & Shao, Y. (2014). The development of drug resistance mutations K103N Y181C and G190A in long term Nevirapine-containing antiviral therapy. *AIDS Research and Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1742-6405-11-36>
- Waters, L., Kambugu, A., Tibenderana, H., Meya, D., John, L., Mandalia, S., Nabankema, M., Namugga, I., Quinn, T. C., Gazzard, B., Reynolds, S. J., & Nelson, M. (2007). Evaluation of Filter Paper Transfer of Whole-Blood and Plasma Samples for Quantifying HIV RNA in Subjects on Antiretroviral Therapy in Uganda Background: Most HIV-infected subjects on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 46(5), 590–593. <http://journals.lww.com/jaids>
- Weldon, W. C., Steven Oberste, M., & Pallansch, M. A. (2016). Standardized methods for detection of poliovirus antibodies. *Methods in Molecular Biology*, 1387, 145–176. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3292-4_8
- Wensing, A. M. J., van Maarseveen, N. M., & Nijhuis, M. (2010). Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral Research*, 85(1), 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.003>
- Willey, R. L., Theodore, T. S., & Martin, M. A. (1994). Amino Acid Substitutions in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 V3 Loop That Change Viral Tropism Also Alter Physical and Functional Properties of the Virion Envelope. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 68(7), 4409–4419.
- World Health Organization. (2012). *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (TaqMan 96)*.
- World Health Organization. (2014). *TECHNICAL AND OPERATIONAL CONSIDERATIONS FOR IMPLEMENTING HIV VIRAL LOAD TESTING*. www.who.int
- World Health Organization. (2015). *GUIDELINE ON WHEN TO START ANTIRETROVIRAL THERAPY AND ON PRE-EXPOSURE PROPHYLAXIS FOR HIV GUIDELINES*.

- World Health Organization. (2016a). *THE USE OF ANTIRETROVIRAL DRUGS FOR TREATING AND PREVENTING HIV INFECTION 2016*.
- World Health Organization. (2016b). *Global report on early warning indicators of HIV drug resistance: technical report*.
- World Health Organization. (2017a). *Global action plan on HIV drug resistance 2017–2021*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- World Health Organization. (2017b). *WHO guidelines on hepatitis B and C testing*.
- World Health Organization. (2017c). *Guidelines on the public health response to pretreatment HIV drug resistance*.
- World Health Organization. (2018). *Centre for Disease Analysis. Web Annex B. WHO estimates of the prevalence and incidence of hepatitis C virus infection by WHO region, 2015 Centre for Disease Analysis*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- World Health Organization; (2019). *UPDATE OF RECOMMENDATIONS ON FIRST-AND SECOND-LINE ANTIRETROVIRAL REGIMENS*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- World Health Organization. (2021). *Consolidated guidelines on HIV prevention, testing, treatment, service delivery and monitoring: recommendations for a public health approach*.
- Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D. E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J. J., Kabongo, J. M. M., Kalengayi, R. M., van Marck, E., Gilbert, M. T. P., & Wolinsky, S. M. (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*, 455(7213), 661–664. <https://doi.org/10.1038/nature07390>
- Xiao, P., Zhou, Y., Lu, J., Yan, L., Xu, X., Hu, H., Li, J., Ding, P., Qiu, T., Fu, G., Huan, X., & Yang, H. (2019). HIV-1 genotype diversity and distribution characteristics among heterosexually transmitted population in Jiangsu province, China. *Virology Journal*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1162-4>
- Yamaguchi, J., Bodelle, P., Vallari, A. S., Coffey, R., Mcarthur, C. P., Schochetman, G., Devare, S. G., & Brennan, C. A. (2004). HIV Infections in Northwestern Cameroon: Identification of HIV Type 1 Group O and Dual HIV Type 1 Group M and Group O Infections. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES*, 20(9), 944–957.
- Yamaguchi, J., Mcarthur, C. P., Vallari, A., Coffey, R., Bodelle, P., Beyeme, M., Schochetman, G., Devare, S. G., & Brennan, C. A. (2006). HIV-1 Group N: Evidence of Ongoing Transmission in Cameroon. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES*, 22(5), 453–457.
- Yamaguchi, J., Vallari, A., Mcarthur, C., Sthreshley, L., Cloherty, G. A., Berg, M. G., & Rodgers, M. A. (2020). Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes HIV-1 Subtype L. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 83(3), 319–322. <https://journals.lww.com/jaids>
- Yebra, G., de Mulder, M., Martín, L., Pérez-Cachafeiro, S., Rodríguez, C., Labarga, P., García, F., Tural, C., Jaén, À., Navarro, G., & Holguín, Á. (2011). Sensitivity of seven HIV subtyping tools

differs among subtypes/recombinants in the Spanish cohort of naïve HIV-infected patients (CoRIS). *Antiviral Research*, 89(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.10.008>

Zdanowicz, M. M. (2006). The Pharmacology of HIV Drug Resistance. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 70(5), 1–9.

Zhu, T., Bette T. Korber†§, Andre J. Nahmiask, Edward Hooper¶, Paul M. Sharp, & David D. Ho*. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*, 391, 594–597.

Zhu, T., Wang, N., Carr, A., Wolinsky, S., & Ho, D. D. (1995). Evidence for Coinfection by Multiple Strains of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype B in an Acute Seroconverter. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 69(2), 1324–1327.

ANEXO I

MATERIAL SUPLEMENTARIO DE MATERIAL Y MÉTODOS

Ficha clínica de los participantes incorporados en el estudio desde los hospitales de Kinshasa.

Numéro d'identification: _____ Date de naissance: __ __ / __ __ / __ __ __ __ (jour / mois / année) Sexe: <input type="checkbox"/> Masculin <input type="checkbox"/> Feminin Date de diagnostic du <u>VIH</u> : __ / __ / __ __ __ __ (jour / mois / année)	Date F1: __ / __ / __ __ __
--	-----------------------------

Numéro d'identification du laboratoire : _____ CD4/mm3 : _____ date : __ / __ / __ __ __ __ (jour / mois / année) Régimes anti rétroviral : 1 _____ Période du traitement (du..... au) 2 _____ Période du traitement (du..... au) 3 _____ Période du traitement (du..... au) 4 _____ Période du traitement (du..... au) _____

- Combien de minutos de marche à pieds de chez vous jusqu'a l'endroit le plus proche où l'on donne les ARVs?**

<15min 15-30min 30-60min >60min
- Avez-vous déjà pris un ARV avant d'être infecté?** Non Oui.

*Si oui, indiquez (si possible) les noms des ARVs reçus et la période.

Nom(s) ARV(s): _____ Période de traitement (du..... au)
- Sur une échelle de 0 à 10, prière d'indiquer votre aptitude de prendre les ARVs exactement tel que c'est prescrit.**

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
- Durant la semaine dernière, combien de fois avez-vous oublié de prendre vos ARVs?**

jamais 1 jour 2 jours 3 jours 3-6 jours tous les jours
- Quand avez-vous commencé à sauter la prise de vos ARVs?**

jamais depuis quelques semaines depuis quelques mois je ne sais pa

Merci beaucoup pour votre collaboration

Protocolo de Thermo Fisher Scientific utilizado para la obtención del ADNc de las muestras DBS.

RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ref: K1632) BM .cDNA
ThermoFisher

Responsable:	Fecha:
--------------	--------

RT para cDNA:	Concentración Tubo	[reacción]	Reacción en 20µL	Reacción en 40 µL	nº muestras	TOTAL
Random Hexamer Primer, (120µL)	100µM	5µM	1	2	x	
Nuclease-free water. (2x1,25mL)	-	-	1	2	x	
5X Reaction Buffer, (500µL)	5X	1X	4	8	x	
RiboLock RNase Inhibitor, (120µL)	20 U/µL	20 U	1	2	x	
dNTP Mix, (250µL)	10mM	1mM	2	4	x	
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (120µL)	200 U/µL	200 U	1	2	x	
RNAmuestra®	Extracción	[0,1-5µg?]	10µL	20µL	x	No suma
TOTAL			20µL	40µL		

Muestra (ARN extraído): 20µL; Vol reacción: 40µL

Preparar máster mix con los reactivos y conservar alícuotas en bloque frío.

CONSERVAR RÁPIDAMENTE MÁSTER MIX -20°C

INOCULACIÓN DE RNA:

20µL de máster mix + 20µL de RNAmuestra

Programa en el termociclador AB2720 c dna (rt) Thermo:

25°C/5min + 42°C/60min + 70°C/5min + 4°C forever

En cuanto comience a pitar el aparato, congelar a -80°C

Tabla Anexo Resumen de publicaciones con estudios de mutaciones de resistencia del VIH-1 en Kinshasa, RDC.

Estudio	Localización en RDC	Año/período	Tipo de muestra	Grupo de población	Método de genotipado	N.º seq	Región genética del VIH	Secuencias disponibles en GenBank
Vidal 2006	Kinshasa, Mbuji-Mayi, Lubumbashi, Kisangani	2002	PBMC	Población centinela	Phy	70	<i>pol (PR,RT), env (V3-V5)</i>	SÍ
Djoko 2011	Kinshasa	2007	Plasma	Militares	Phy	94	<i>pol (PR, RT)</i>	SÍ
Muwonga 2011	Kinshasa, Matadi, Lubumbashi, Mbuji-Mayi	2008	Plasma	Pacientes con TAR, Pacientes naive	Phy	93	<i>pol (PR, RT)</i>	SÍ
Kamangu 2015	Kinshasa	2013-2014	Plasma	Pacientes naive	Herramienta de genotipado online	153	<i>pol (PR, RT)</i>	NO
Eun Hee Kwon 2020	RDC muchos	2012-2013	DBS	Trabajadoras Sexuales	Herramienta de genotipado online	238	<i>pol env</i>	SI
Rubio-Garrido 2021	Kinshasa	2016-2018	DBS	Niños, adolescentes	Phy	55	<i>pol (PR, RT, INT)</i>	SÍ
Bossard et al 2021	Kenia, Kinshasa	2017-2018	Plasma y DBS	Pacientes con TAR avanzado	Herramienta de subtipaje online	141	<i>pol (RT)</i>	NO
Estudio actual	Kinshasa	2016-2019	DBS	Adultos	Phy	230	<i>pol (PR, RT, INT)</i>	SÍ

RECURSOS DE INTERNET

– *HIVdb* (Universidad de Stanford, EE.UU.)

<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>

– *Geno2pheno* (Max Planck Institut informatic)

<https://www.geno2pheno.org/>

– Listado de *CRF* del Laboratorio Nacional de Los Alamos

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>

– Alineamientos de secuencias VIH del Laboratorio Nacional de Los Alamos

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>

– Base de datos VIH del Laboratorio Nacional de Los Alamos

<https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>

– *Clustal Omega*

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

– *MedCalc Software Ltd. Diagnostic test evaluation calculator.*

https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php (Version 20.013)

– *GenBank*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

– *PubMed*

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

ANEXO II

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES SURGIDAS DE ESTA TESIS DOCTORAL:

- **Barquín D**, Ndarabu A, Carlos S, Fernández-Alonso M, Rubio-Garrido M, Makonda B, Holguín Á, Reina G. HIV-1 diagnosis using dried blood spots from patients in Kinshasa, DRC: a tool to detect misdiagnosis and achieve World Health Organization 2030 targets. *Int J Infect Dis.* 2021 Aug 19; S1201-9712(21)00669-X. (JCR 2020: IF 3,623; Q2).
- **Barquín D**, Ndarabu A, Rubio-Garrido M, Carlos S, Holguín Á, Fernández-Alonso M, Makonda B, Reina G. *"HIV-1 variants and drug resistance mutations to antiretrovirals among HIV-1 recombinant forms in Kinshasa"* (EN REDACCIÓN).
- Carrasco T, **Barquín D**, Ndarabu A, Fernández-Alonso M, Rubio-Garrido M, Carlos S, Makonda B, Holguín Á, Reina G. HCV Diagnosis and Sequencing Using Dried Blood Spots from Patients in Kinshasa (DRC): A Tool to Achieve WHO 2030 Targets. *Diagnostics (Basel)* 2021 Mar 15;11(3):522. doi: 10.3390/diagnostics11030522. (JCR 2020: IF 3,706; Q2).

COLABORACIÓN EN OTRAS PUBLICACIONES:

- Rubio-Garrido M., Ndarabu A., Reina G., **Barquín D.**, Fernández-Alonso M., Carlos S., Holguín A. Utility of POC Xpert HIV-1 Tests For Detection-Quantification Of Complex HIV Recombinants Using Dried Blood Spots From Kinshasa, D. R. Congo. *Scientific Reports* 9, 5679 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41963-y>. (JCR 2019: IF: 3,998; Q1).
- Rubio-Garrido M., González-Alba J.M., Reina G., Ndarabu A., **Barquín D.**, Carlos S., Galán J.C., Holguín A. Current and historic HIV-1 molecular epidemiology in paediatric and adult population from Kinshasa in the Democratic Republic of Congo. *Scientific Reports* 10, 18461 (2020). <https://www.nature.com/articles/s41598-020-74558-z>. (JCR 2020: IF: 4,380; Q1).

- Rubio-Garrido M., Reina G., Ndarabu A., Rodriguez-Galet A., Valadés-Alcaraz A., **Barquín D.**, Carlos S., Holguín A. High drug resistance levels compromise the control of HIV in paediatric and adolescent population in Kinshasa, the Democratic Republic of Congo. PLoS One. 2021 Apr 15;16(4): e0248835. doi: 10.1371/journal.pone.0248835. (JCR 2020: IF: 3.240; Q2).

- Rodríguez-Galet A., Rubio-Garrido M., Valadés-Alcaraz A., Reina G., Ndarabu A., **Barquín D.**, Carlos S., Holguín A. Prevalence of protective IgG antibodies against six vaccineable pathogens in children and adolescents from Kinshasa, in the Democratic Republic of Congo using plasma and DBS. (ENVIADO)

ANEXO III

PREMIOS

PREMIOS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL:

- Primer Premio, Mejor Comunicación, XXII Congreso SEIMC Madrid 2019. “Objetivo 90-90-90 en Kinshasa (R. D. Congo): detección de anticuerpos a partir de sangre seca y errores en el diagnóstico de la infección por VIH”.
- Primer Premio, Mejor Comunicación, IV Congreso GEHEP Córdoba 2018. “Prevalencia de la infección por Virus Hepatitis C en pacientes infectados por VIH-1 en Kinshasa, República Democrática del Congo (Cohorte OKAPI)”.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- 25th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Boston (EEUU), 2018:

Rubio M, Ndarabu A, Reina G, Barquín D, Carlos S, Holguín A. Utility of POC Xpert HIV-1 Tests for Detection- Quantification of Complex Recombinants (P 566).

- XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Bilbao 2018:

G. Reina, M. Rubio, A. Ndarabu, D. Barquín, P. Sanz, M. Fernández- Alonso, S. Carlos, A Holguín. "Prevalencia de mutaciones de resistencia de VIH- 1 en pacientes adultos y pediátricos de Kinshasa (República Democrática del Congo)".

- X Congreso Nacional Grupo de Estudio del VIH/SIDA (GESIDA) SEIMC, Madrid 2018:

Barquín D, Ndarabu A, Fernández- Alonso M, Rubio M, Sanz P, Holguín A, Carlos S, Reina G. *High prevalence of antiretroviral resistance among HIV- 1 - infected adults in Kinshasa, Democratic Republic of Congo (OKAPI Cohort).*

Rubio M, Ndarabu A, Reina G, Barquín D, Gutiérrez M, Carlos S, Fernández- Alonso M and Holguín A. *Evaluation of webs for rapid subtyping in complex HIV- 1 variants from Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.*

Rubio M, Ndarabu A, Reina G, Barquín D, Gutiérrez M, Carlos S, Fernández- Alonso M and Holguín A. *HIV-1 diagnosis and virological analysis using dried blood from an infected pediatric population from Kinshasa, Democratic Republic of Congo.*

- IV Congreso Nacional Grupo de Estudio de las Hepatitis Víricas (GEHEP), Córdoba 2018:

Barquín D, Ndarabu A, Fernández- Alonso M, Rubio M, Sanz P, Carlos S, Holguín A, Reina G. Características de la infección por Virus Hepatitis C en pacientes infectados por VIH- 1 en Kinshasa, República Democrática del Congo (Cohorte OKAPI)

Barquín D, Ndarabu A, Fernández- Alonso M, Rubio M, Sanz P, Carlos S, Holguín A, Reina G. Prevalencia de la infección por Virus Hepatitis B en pacientes infectados por VIH- 1 en Kinshasa, República Democrática del Congo (Cohorte OKAPI)

- 10th International AIDS Society (IAS) Conference on HIV Science, México DF, Mexico 2019:

G. Reina, A. Ndarabu, Barquín D, M. Rubio- Garrido, P. Martínez de Aguirre, M. Fernández- Alonso, S. Carlos, A. Holguín. Primary resistance to integrase inhibitors among recombinants in Kinshasa using DBS. "*Primary resistance to integrase inhibitors among recombinants in Kinshasa using DBS*".

- XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Madrid 2019:

Barquín D, Ndarabu A, Fernández- Alonso M, Sanz P, Rubio M, Holguín A, Carlos S, Reina G: "Objetivo 90 -90 -90 en Kinshasa (R.D. Congo): detección de anticuerpos a partir de sangre seca y errores en el diagnóstico de la infección por VIH".

Carlos S, Roca MM, Barquín D, Ndarabu A, Fernández- Alonso M, Sanz P, Rubio M, Holguín A, Reina G. "Objetivo 90 - 90 - 90 en Kinshasa (R. D. Congo): asociación entre una baja adherencia y una mayor carga viral y desarrollo de mutaciones K103 N y M184V/I"

- XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Zaragoza, 2020

Barquín D, Carrasco T, Ndarabu A, Fernández- Alonso M, Rubio- Garrido M, Carlos S, Holguín A, Reina G: “Alta prevalencia del Virus Hepatitis C subtipo 4 r con susceptibilidad desconocida a los antivirales en pacientes VIH de Kinshasa, RDC”.

Rodríguez- Mateos M, Jaso J, Barquín D, Carlos S, Rubio- Garrido M, Fernández- Alonso M, Holguín A, Reina G: “Evaluación de muestra de sangre seca (DBS) para estudiar la inmunidad frente a sarampión, rubeola, parotiditis, difteria, tétanos y tos ferina”.

- 23rd International AIDS Conference. San Francisco, 2020.

Rubio- Garrido M, González JM, Reina G, Ndarabu A, Barquín D, Carlos S, Galán JC, Holguín A.” *Is something changing in the molecular epidemic of HIV- 1 in Kinshasa, D. R. Congo?”*

XXIV Congreso Virtual de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), 2021

Barquín D, Martínez De Aguirre P, Ndarabu A, Rubio Garrido M, Fernández Alonso M, Carlos S, Makonda B, Holguín A, Reina G. Resistencia a inhibidores de la integrasa de VIH- 1 circulante en Kinshasa (República Democrática del Congo).

VI Congreso Nacional del Grupo de Estudio de Hepatitis Víricas (GEHEP) de la SEIMC, Granada 2021:

Barquín D, Carrasco T, Ndarabu A, Fernández- Alonso M, Rubio- Garrido M, Carlos S, Holguín A, Reina G: “Alta prevalencia del Virus Hepatitis C subtipo 4r con susceptibilidad desconocida a los antivirales en pacientes VIH de Kinshasa, RDC”.