

TRABAJO ORIGINAL

Resistencia a fármacos antirretrovirales en la Clínica de VIH del Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín

Antiviral Drug Resistance in the HIV Clinic, Carlos Andrade Marín Specialties Hospital

Emilia Alejandra Espín Jaramillo¹, Byron Fabián Núñez-Freile², David Santiago Larreátegui Romero², Eduardo Mauricio Espinel Lalama³, María Fernanda Luján Jiménez¹¹ Unidad de Genética y Molecular, Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín² Servicio de Infectología, Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín³ Servicio de Epidemiología, Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín

RESUMEN

Introducción. La resistencia a los fármacos antirretrovirales es un problema de importancia mundial. El tratamiento antirretroviral procura disminuir la carga viral y permitir la reconstitución inmune, logrando la máxima supresión viral por el mayor tiempo posible, con un mínimo impacto en las actividades del paciente. **Objetivo.** Evaluar la prevalencia de resistencia antiviral en pacientes sometidos a la prueba de resistencia viral. **Material y métodos.** Para el estudio se recolectaron muestras de plasma de 41 pacientes de la clínica de VIH del Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín con sospecha clínica de resistencia a antirretrovirales y fallo virológico. Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso y se procesaron de acuerdo a las condiciones del fabricante en cuanto a extracción de ARN y secuenciación. Los resultados fueron analizados con el software DeepChek®, específico para detectar resistencia antirretroviral de VIH. **Resultados.** Cuarenta y un pacientes fueron seleccionados para el análisis de resistencia antirretroviral, más del 85% (35/41) de los pacientes estudiados presentaron resistencia a algún fármaco antirretroviral. La mayoría de pacientes (71%; 29/41) resultaron tener algún tipo de resistencia a inhibidores de nucleósidos de la transcriptasa inversa (NRTI) e inhibidores de no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTI) conjuntamente. **Conclusiones.** El problema de resistencia viral es evidente en los pacientes contagiados por VIH, en nuestro caso se observa alta resistencia a NRTI y NNRTI. Se pudieron identificar pacientes con resistencia primaria y resistencia secundaria, generando inquietud en la importancia de la adherencia del paciente al tratamiento, con el fin de tener supresión antiviral efectiva.

Palabras clave: VIH; Mutación; resistencia Viral; Antirretrovirales.

ABSTRACT

Introduction. Resistance to antiviral drugs is a major problem worldwide. Antiretroviral therapy seeks to reduce viral load and allows for immune reconstitution, achieving viral suppression for as long as possible, with minimum impact on patient activities. **Objective.** To evaluate the prevalence of antiviral resistance in patients subjected to viral resistance test. Resistance to antiretrovirals has clinical, virological and immunological implications, so monitoring resistance in case of virological failure optimizes therapeutic scheme selection, to minimize costs and obtain greater treatment success. **Materials and methods.** Plasma samples with clinical suspicion of antiretroviral resistance and virological failure were collected from 41 patients at the HIV Clinic, Carlos Andrade Marín Specialties Hospital. All samples were stored at -80°C until processed, following Manufacturer conditions for RNA extraction and sequencing. Results were analyzed using DeepChek® for the detection of HIV antiretroviral resistance. **Results.** Over 85% of patients studied had resistance to a antiretroviral drug. Most patients (71%) were found to have some type of combined resistance to NRTI and NNRTI. **Conclusions.** The problem of viral resistance is evident in patients infected with HIV. We observed high resistance to NRTI and NNRTI. Patients with primary and secondary resistance were identified, raising concerns about the importance of patient adherence to treatment, to achieve effective antiviral suppression.

Keywords: HIV; Mutation; Viral drug resistance; Anti-retroviral agents.

OPEN ACCESS

Cómo citar este artículo:

Espín EA, Nuñez-Freile BF, Larreátegui DA, Luján MF, Espinel EM. Resistencia a fármacos antirretrovirales en la Clínica de VIH del Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín. Rev Med CAMbios HCAM 2018; 17(1):3-9.

Correspondencia:Dra. Emilia Alejandra Espín Jaramillo
Carlos Cabeza N50-109 y Homero Salas,
Quito-Ecuador. 170511**Correo:** emilia_espin@yahoo.com
Teléfono: (593) 99 543 4455**Recibido:** 2018-04-16**Aprobado:** 2018-07-31**Publicado:** 2018-11-08**Copyright:** ©HCAM

Atribución/Reconocimiento 4.0 Internacional

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 78 millones de personas han sido infectadas con VIH hasta la actualidad, de estas infecciones 39 millones han fallecido.¹ En Ecuador se registran 4 863 casos nuevos en el 2016, de los cuales en la provincia de Guayas cubre el 50,3% de casos nuevos, mientras que la provincia de Pichincha tiene el 10,2% de casos nuevos.² Pocos datos se han generado en Ecuador, detectando mutaciones y resistencia a antirretrovirales especialmente a inhibidores de transcriptasa reversa.³ Los tratamientos antirretrovirales (ARV) constituyen hoy una herramienta importante asociada con prolongar la supervivencia, reducir morbilidad y prevenir la transmisión de VIH. Aproximadamente 10 millones de personas que viven con el virus han recibido tratamiento ARV; el uso de ARV ha permitido disminuir las muertes relacionadas con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en porcentajes mayores al 30% desde el 2001. Actualmente se disponen de 6 grupos de fármacos, entre los cuales están: inhibidores de proteasa (IP), inhibidores de nucleósidos de la transcriptasa inversa (NRTI), inhibidores de no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTI), inhibidores de integrasa (INI), inhibidores de fusión (IF) e inhibidores de entrada (EI).⁴ El objetivo de realizar supresión de viremia y conservar la función inmunológica constituyen retos para manejo de pacientes con VIH a lo largo del tiempo, intentando retrasar el desarrollo de mutaciones resistentes y mantener la activación inmune. La selección de fármacos para lograr una eficacia virológica combinan diferentes factores para evitar efectos adversos, determinar la carga de píldoras y frecuencia de dosificación, el potencial de interacción fármaco-fármaco, condiciones comórbidas, condición social y resultados de pruebas de resistencia.⁵ En 2014, la UNAIDS estableció una estrategia denominada “90-90-90”, refiriendo lo siguiente: diagnosticar al 90% de las personas infectadas por VIH, ofrecer tratamiento al 90% de las personas diagnosticadas, y lograr supresión viral completa de 90% en personas con tratamiento, hasta el 2020.⁶ Los esfuerzos en investigación y desarrollo crecen conjuntamente con la capacidad del virus para generar resistencias a nue-

vos fármacos, una de las pruebas disponibles para determinar la resistencia de viral es secuenciación, permitiendo al médico tratante resolver problemas de decisión al momento de escoger la mejor terapia para el paciente. Considerando que no existe una vacuna disponible, todos estos esfuerzos con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes y reducir morbilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio retrospectivo, fue realizado en pacientes del Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín (HECAM), pertenecientes a la clínica de VIH.

Pacientes del estudio: Se seleccionaron pacientes en tratamiento antirretroviral que respondieron al tratamiento registrándose fallo viral con persistencia de cargas virales superiores a 4 000 copias/mL en exámenes realizados en intervalos mayores a tres meses entre diciembre del 2015 y abril del 2017, sin distinción del tiempo que llevan en tratamiento o fármacos usados. Un total de 41 pacientes fueron seleccionados para el estudio, 5 de estos pacientes de otras casas de salud (3 pacientes del Hospital Enrique Garcés y 2 pacientes del Hospital Vicente Corral Moscoso).

Se registró la carga viral específica de cada muestra y los registros de CD4. Además, se registraron datos relacionados con: posible vía de contagio, datos relacionados con la adherencia al tratamiento y a las visitas de control, guardando la confidencialidad para lo cual se omitieron en los registros nombres o datos personales, utilizándose como identificación códigos individuales.

Recolección y almacenamiento de muestras: se tomaron 3 muestras de sangre recolectadas en tubos de tapa lila con anticoagulante EDTA; se separó el plasma por centrifugación y fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento.

Extracción de ácidos nucleicos: para la extracción de ARN viral se utilizó el kit validado *High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit*, partiendo de 2,5 mL de plasma congelado. Se siguieron las instrucciones del fabricante al mezclar el plasma con 2,5 mL de *working solution* (2,5 mL de *binding buffer* + 15 µL

de Poly A) y 250 µL de proteinasa K. Las muestras fueron incubadas a 70°C por 15 minutos. Luego se colocó 1 mL de *binding buffer* y una vez mezclado se colocó el material lisado en la columna de extracción. Después de varios lavados se llevó el ARN obtenido a 50 µL de *elution buffer*, al cual se adhirió 2 µL de MS2 en una concentración de 10 ng/µL de ARN de bacteriófago. El ARN se conservó a -80°C para luego proceder a la secuenciación.

Secuenciación: se realizó la preparación de amplicones transformando el ARN en ADN para la futura secuenciación. Las secuencias de ADN fueron analizadas por la técnica de pirosecuenciación, en el equipo Junior 454-Roche, siguiendo las especificaciones del fabricante. Los resultados fueron analizados en el programa Deepchek®, donde las secuencias fueron comparadas con la base de Stanford para análisis de resistencias significativas. Dentro de los parámetros analizados se obtuvo:

- La subtipificación cualitativa de los virus presentes en cada muestra.
- Las resistencias significativas en las tres opciones de magnitud de análisis que permitió el programa bioinformático (1, 5 y 20% de las poblaciones virales presentes en cada paciente).
- Mutaciones más prevalentes que resultaron en resistencia viral.
- Mutaciones que estuvieron presentes pero no confieren resistencia viral.

Se realizó una clasificación fenotípica para los diversos fármacos de acuerdo a los resultados del bioanálisis, en comparación con los estándares correspondientes.

Se clasificó como pacientes no adherentes al tratamiento a aquellos que no tuvieron genes de resistencia y demostraron poca regularidad en las visitas a control y en la toma de las dosis.

Se clasificó a los pacientes como resistencia primaria en base al fallo virológico presente después de realizar una segunda carga viral y que el paciente no haya recibido tratamiento alguno.

RESULTADOS

La media de la edad fue de 39 años y la mayoría de la población se encuentra entre 30 a 50 años de edad (70%; 28/41).

Dentro de los rangos de edad el 19,5% (8/41) tiene de 20 a 30 años, 43,9% (18/41) de 30 a 40 años, 24,4% (10/41) de 40 a 50 años y 12,2% (5/41) mayores de 50 años. Los pacientes estudiados fueron en su mayoría hombres con 87,8% (36/41) y mujeres con 12,2% (5/41).

Treinta y seis pacientes fueron tratados en el Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín, mientras que cinco pacientes pertenecieron a otras casas de salud.

El riesgo de transmisión por vía sexual constituyó la vía más prevalente de transmisión en los pacientes estudiados; fue igual en hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y heterosexuales (tabla 1).

Tabla 1. Riesgo de transmisión de VIH de 36 pacientes del HECAM.

Factor de riesgo	Pacientes (%)
Hombres que tienen sexo con hombres	19 (52,8%)
Heterosexual	18 (50%)

Elaborada por los autores.

La media de los valores de carga viral es 4,72 Log₁₀ ARN copias/mL. En cuanto a los valores de CD4 se obtuvo una media de 189,6 células/mL (tabla 2).

Tabla 2. Datos de carga viral y CD4.

	Carga viral (Log ₁₀ ARN copias/mL)	CD4* (células/mL)
Valor más bajo	3,6	0,9
Valor más alto	6,7	1189
Promedio	4,7	213
Percentil 25	4,3	42
Varianza	0,4	62335
Desviación estándar	0,7	245

*Datos de CD4 únicamente para los pacientes del HECAM. Elaborada por los autores.

Seis pacientes de la muestra no tuvieron presencia de genes de resistencia y fueron catalogados como no adherentes. Treinta pacientes fueron clasificados como resistencia secundaria y cinco como resistencia primaria (12,2%; 5/36) bajo los criterios de tener un fallo viral comprobado, después de realizar una segunda carga viral y constatar que el fallo virológico se conserva a pesar de encontrarse ya en tratamiento antirretroviral (figura 1).

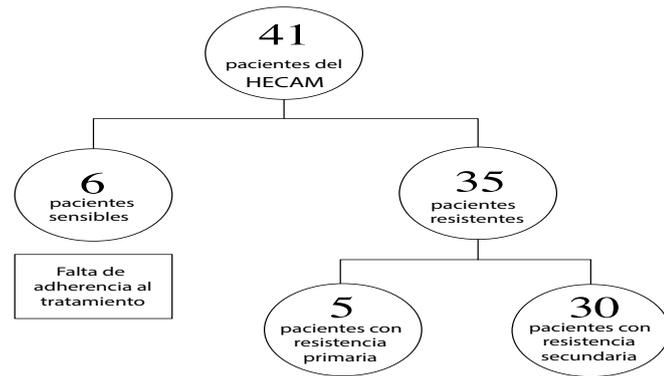


Figura 1. Clasificación de pacientes sensibles y resistentes en función de la prueba genética, adherencia y clasificación del tipo de resistencia

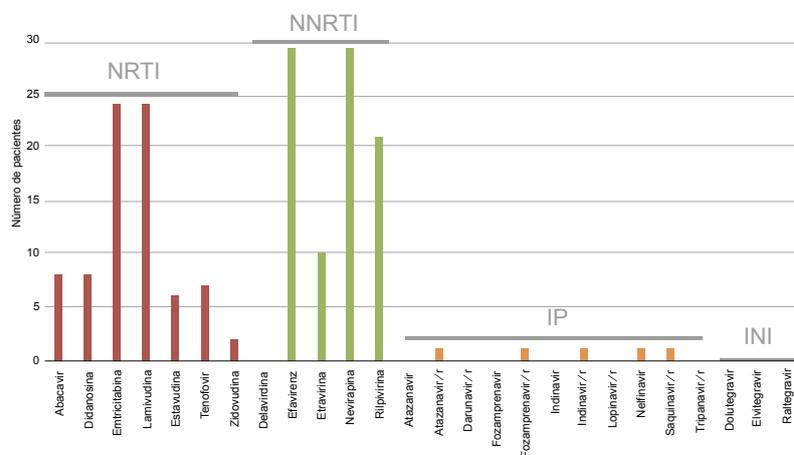


Figura 2. Resistencia antirretroviral por fármaco

Gracias a las características de pirosecuenciación, se pudo diferenciar prevalencia de mutaciones en la población viral o mezcla de poblaciones virales. Así se pudo identificar 32 (78%) pacientes que tuvieron resistencia >20% de su población viral. En la tabla 3 se detallan los pacientes que presentaron resistencia al 20%, 5% y 1%.

Tabla 3. Resistencia según las poblaciones virales.

Porcentaje de poblaciones virales	Número de pacientes resistentes
Solo al 20	26
Solo al 5	0
Solo al 1	1
Porcentajes combinados	
20 y 5	3
20 y 1	2
5 y 1	2
20, 5 y 1	1

También se analizó las secuencias de integrasa (IN), proteasa (P) y transcriptasa (TR) para determinar el subtipo viral. El subtipo más prevalente en secuencias de TR y P fue el subtipo B (85,4%-63,4% respectivamente) y en IN es el subtipo 25_cpx (75,6%) (tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de subtipos virales por región genómica.

Subtipos	Según TR	Según P	Según IN
B	85,4	63,4	17,1
02_AG	4,9	4,9	0
29_BF	2,4	0	0
37_cpx	20,5	0	0
42_BF	2,4	0	0
28_BF	2,4	0	0
7_BC	0	31,7	0
25_cpx	0	0	75,6
F1	0	0	2,4
D	0	0	2,4
39_BF	0	0	2,4

Tabla 6. Resumen de mutaciones en resistencia primaria y secundaria.

Inhibidores nucleósidos y no nucleósidos de transcriptasa inversa

Tipo de mutación	K103N	M184V/I	Y188L	K65R	V106I	V179D	V179I	K101E	V179L
Resistencia primaria	40% (2/5)	60% (3/5)	40% (2/5)	60% (3/5)	40% (2/5)	0% (0/5)	40% (2/5)	40% (2/5)	20% (1/5)
Resistencia secundaria	77% (23/30)	80% (24/30)	57% (17/30)	20% (6/30)	27% (8/30)	27% (8/30)	20% (6/30)	17% (5/30)	17% (5/30)

de propagación, comparado con otras cepas, esto es importante en países donde los NNRTI son usados como tratamiento de primera línea, y donde no se disponen de pruebas de rutina de resistencia o carga viral. Esto aumenta el riesgo de propagación de resistencia y limita el éxito del tratamiento de segunda línea.^{1,20}

Los pacientes analizados en el presente estudio tuvieron entre 2 y 23 años de recibir tratamiento, la mayoría se pueden considerar pacientes con infección crónica lo cual implica una mezcla compleja de variantes genéticas, por lo que claramente se pudo ver que más del 80% de pacientes presentaron resistencia a 2 grupos de ARV.⁹ Adicionalmente, en el tiempo de exposición a ARV la interrupción de tratamiento fallido y mala adherencia de los pacientes llevó a una aparición de variantes, por presión y adaptación de las cepas originales o adquiridas a lo largo del tratamiento. Se observó que seis pacientes no respondieron al tratamiento correctamente y al realizar la prueba de resistencia, estos no presentaron ninguna resistencia detectable, lo que denota la alta cantidad de pacientes que no toman o tienen baja o nula adherencia al tratamiento.

Existieron pacientes que nunca recibieron tratamiento con ciertos fármacos pero presentaron mutaciones que denotan resistencia al mismo, como fue el caso de un paciente en el presente estudio. Esto pudo deberse a que hubo aparición de mutaciones por presencia de evolución genética constante. Además, se pudo relacionar con la presencia de resistencias en poblaciones menores ($\leq 5\%$); también se observó la aparición de mutaciones en regiones del genoma codificantes para proteasa (en pacientes que no recibieron tratamiento para esta enzima), y debido a la sensibilidad de la técnica de pirosecuenciación se observó una serie de mutaciones que son descartadas en el análisis final de datos, ya que

constituyeron mutaciones espontáneas que son sinónimas y no permitieron ver resistencia fenotípica. Se debe tener en cuenta que estas poblaciones minoritarias podrían en un futuro generar resistencias mayores que puedan servir de guía para el tratamiento.⁹

En el presente estudio se determinó la presencia de mutaciones para inhibidores de proteasa, siendo las variantes más predominantes: A71T/V (45%, n=15), L101/V (18%, n=6), K20R (12%, n=4). Comparado con otros estudios las mutaciones IP son detectadas con más frecuencia a través de técnicas de secuenciación de última generación, como en nuestro estudio. Se concluye que el hallazgo de estas mutaciones, no tienen una implicación fenotípica de resistencia en los pacientes. También se pudo atribuir la presencia de mutaciones IP, a la presencia de mala adherencia de esta forma se va generando presión genética y revelando variantes minoritarias de resistencia.^{4,15}

Se presentan dentro de las mutaciones más frecuentes observadas K103N, M184V/I, Y188L, K65R V106I, V179I/D, K101E y V179L, las mismas que no han sido descritas previamente en nuestro país a excepción de un único estudio publicado que fue realizado en la costa ecuatoriana en donde se determinaron otras mutaciones presentes siendo únicamente M184V/I la presente en ambas regiones. Se sugiere continuar con estudios de resistencia para poder comparar a su vez con otros países especialmente de latinoamérica.^{3,16}

CONCLUSIÓN

Se puede concluir que un evento importante en el manejo de resistencia ARV es la adherencia de los pacientes,

casi un 50% de los pacientes han sido en algún período de su tratamiento malos adherentes con tratamiento intermitentemente, por lo que muchos hospitales están enfocados al manejo personalizado y seguimiento del paciente como medida para evitar la generación de resistencias al tratamiento.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico; ARN: ácido ribonucleico; ARV: antiretroviral; EDTA: ácido etil diaminotetraacético; EI: inhibidores de entrada; IF: inhibidores de fusión; IN: integrasa; INI: inhibidores de integrasa; IP: inhibidores de proteasa; NRTI: inhibidores de nucleósidos de la transcriptasa inversa; NNRTI: inhibidores de no nucleósidos de la transcriptasa inversa; P: proteasa; TR: transcriptasa; UNAIDS: ONUSIDA; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

CONTRIBUCIÓN DE LOS

AUTORES

EE: Concepción y diseño del trabajo. Recolección y obtención de resultados. Análisis e interpretación de datos. Redacción del manuscrito.

BN, DL, ME, ML: Revisión crítica del manuscrito. Aprobación de su versión final. Todos los autores leyeron y aprobaron la versión final del artículo.

INFORMACIÓN DE LOS

AUTORES

Espín Jaramillo Emilia Alejandra. Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica del Ejército; Maestría en Microbiología, Universidad San Francisco de Quito. Integrante de la Unidad de Genética y Molecular, Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín,

ORCID : <https://orcid.org/0000-0003-1704-0159>

Núñez-Freile Byron Fabián. Médico Especialista en Infectología. Servicio de Infectología, Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín. ORCID : <https://orcid.org/0000-0003-2375-7578>
Larreátegui Romero David Santiago. Médico Especialista en Medicina Interna. Servicio de Infectología, Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín. ORCID : <https://orcid.org/0000-0003-4927-9981>.

Espinel Lalama Eduardo Mauricio. Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí -ULEAM. Servicio de Epidemiología, Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín. ORCID : <https://orcid.org/0000-0002-6214-227X>.

Luján Jiménez María Fernanda. Médico Especialista en Hematología, Universidad San Francisco de Quito. Jefe de la Unidad de Genética y Molecular, Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín. ORCID : 0000-0001-7292-7794.

DISPONIBILIDAD DE DATOS Y MATERIALES

Se utilizaron recursos bibliográficos de uso libre y limitado. La información recolectada está disponible bajo requisición al autor principal.

APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA Y CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPACIÓN

El artículo científico fue aprobado por pares y por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos -CEISH/HECAM.

CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

La publicación fue aprobada por el Consejo Editorial del HECAM.

FINANCIAMIENTO

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del HECAM.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores no reportan ningún conflicto de interés.

AGRADECIMIENTOS

Por la colaboración en la revisión, corrección y guía del presente trabajo agradezco a los doctores co autores del presente artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Musingwini TV, Zhou DT, Mhandire D, Duri K, Gomo E, Oktedalen O, Chimukangara B, Shamu T, Shawarira-Bote S, Dandara C, Stray-Pedersen B. Use of Proviral DNA to Investigate Virus Resistance Mutations in HIV-infected Zimbabweans. *Open Microbiol J*. 2017 Apr 28;11:45-52. DOI: 10.2174/1874285801711010045. eCollection 2017. PubMed PMID: 28553415; PubMed Central PMCID: PMC5427698.
- DNEAIS-MSP. Ecuador: Ministerio de Salud Pública. [citado 12 junio 2017]. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/informacion-estadistica-de-produccion-de-salud/>
- González-González M, Correa-Sierra C, Hermida-Álava K, Machado-Díaz A, Gómez-Andrade LF, Castillo-Segovia M, Pérez-Santos CL, Kouri-Cardellá V. [Genetic analysis of the mutations in HIV-1 infected population in Ecuador]. *Rev Chilena Infectol*. 2018;35(1):49-61. DOI: 10.4067/s0716-10182018000100049. Spanish. PubMed PMID: 29652972.
- James OE, Johanna L, Rawlings D, Babajehson M, Ashrad I, Anne D, Abimiku A, Dakum P, Gillian H, Ndambi N. A23 Identification of HIV drug resistance mutation patterns using illumina MiSeq next generation sequencing in patients failing second-line boosted protease inhibitor therapy in Nigeria. *Virus Evol*. 2017 Mar 5;3(Suppl 1). pii: vew036.022. DOI: 10.1093/ve/vew036.022. eCollection 2017 Mar. PubMed PMID: 28845272; PubMed Central PMCID: PMC5565984.
- Cihlar T, Fordyce M. Current status and prospects of HIV treatment. *Curr Opin Virol*. 2016 Jun;18:50-6. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.03.004. Epub 2016 Mar 28. Review. PubMed PMID: 27023283.
- UNAIDS. Documents. 90-90-90 - An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic. 01 January 2017. Disponible en: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/90-90-90_en.pdf.
- Junqueira DM, Almeida SE. HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. *Virology*. 2016 Aug;495:173-84. DOI: 10.1016/j.virol.2016.05.003. Epub 2016 May 23. Review. PubMed PMID: 27228177.
- Pessôa R, Sanabani SS. High prevalence of HIV-1 transmitted drug-resistance mutations from proviral DNA massively parallel sequencing data of therapy-naïve chronically infected Brazilian blood donors. *PLoS One*. 2017 Sep 27;12(9):e0185559. DOI: 10.1371/journal.pone.0185559. eCollection 2017. PubMed PMID: 28953964; PubMed Central PMCID: PMC5617215..
- Little SJ, Frost SD, Wong JK, Smith DM, Pond SL, Ignacio CC, Parkin NT, Petropoulos CJ, Richman DD. Persistence of transmitted drug resistance among subjects with primary human immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2008 Jun;82(11):5510-8. DOI: 10.1128/JVI.02579-07. Epub 2008 Mar 19. PubMed PMID: 18353964; PubMed Central PMCID: PMC2395184.
- Wertheim JO, Oster AM, Johnson JA, Switzer WM, Saduvala N, Hernandez AL, Hall HI, Heneine W. Transmission fitness of drug-resistant HIV revealed in a surveillance system transmission network. *Virus Evol*. 2017 Apr 19;3(1):vex008. DOI: 10.1093/ve/vex008. eCollection 2017 Jan. PubMed PMID: 28458918; PubMedCentral PMCID: PMC5399924..
- Laguna-Torres V, Alberto, Olson James, L. Sánchez José, Montano Silvia, Chauca Gloria, Carrión Gladys et al. Distribución de los subtipos del VIH-1 en nueve países de América del Sur, 1995-2002. *Rev. Perú. med. exp. salud publica [Internet]*. 2005 Mar [citado 2018 Sep 18]; 22(1):12-17. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000100003&lng=es.
- Moscona R, Ram D, Wax M, Bucris E, Levy I, Mendelson E, Mor O. Comparison between next-generation and Sanger-based sequencing for the detection of transmitted drug-resistance mutations among recently infected HIV-1 patients in Israel, 2000-2014. *J Int AIDS Soc*. 2017 Aug 10;20(1):21846. DOI:10.7448/IAS.20.1.21846. PubMed PMID: 28799325; PubMed Central PMCID: PMC5577736.
- Barbour JD, Hecht FM, Wrin T, Liegler TJ, Ramstead CA, Busch MP, Segal MR, Petropoulos CJ, Grant RM. Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults. *AIDS*. 2004 Aug 20;18(12):1683-9. PubMed PMID: 15280779.
- Hance AJ, Lemiale V, Izopet J, Lecossier D, Joly V, Massip P, Mammano F, Descamps D, Brun-Vézinet F, Clavel F. Changes in human immunodeficiency virus type 1 populations after treatment interruption in patients failing antiretroviral therapy. *J Virol*. 2001 Jul;75(14):6410-7.

- PubMed PMID: 11413308; PubMed Central PMCID: PMC114364.
15. Fisher R, van Zyl GU, Travers SA, Kosakovsky Pond SL, Engelbrech S, Murrell B, Scheffler K, Smith D. Deep sequencing reveals minor protease resistance mutations in patients failing a protease inhibitor regimen. *J Virol*. 2012, Jun;86(11):6231-7. DOI: 10.1128/JVI.06541-11. Epub 2012 Mar PubMed PMID:22457522; PubMed Central PMCID: PMC3372173.
 16. Ruelle J, Roman F, Vandenbroucke AT, Lambert C, Fransen K, Echahidi F, Piérard, D, Verhofstede C, Van Laethem K, Delforge ML, Vaira D, Schmit JC, Goubau P. Transmitted drug resistance, selection of resistance mutations and moderate antiretroviral efficacy in HIV-2: analysis of the HIV-2 Belgium and Luxembourg database. *BMC Infect Dis*. 2008 Feb 27;8:21. DOI: 10.1186/1471-2334-8-21. PubMed, PMID: 18304321; PubMed Central PMCID: PMC2292191.
 17. Cabello M, Junqueira DM, Bello G. Dissemination of nonpandemic Caribbean HIV-1 subtype B clades in Latin America. *AIDS*. 2015 Feb 20;29(4):483-92. DOI: 10.1097/QAD.0000000000000552. PubMed PMID: 25630042.
 18. Pagán I, Holguín A. Reconstructing the timing and dispersion routes of HIV-1 subtype B epidemics in the Caribbean and Central America: a phylogenetic story. *PLoS One*. 2013 Jul 9;8(7):e69218. DOI: 10.1371/journal.pone.0069218. Print 2013. PubMed PMID: 23874917; PubMed Central PMCID: PMC3706403.
 19. Wertheim JO, Oster AM, Johnson JA, Switzer WM, Saduvala N, Hernandez AL, Hall HI, Heneine W. Transmission fitness of drug-resistant HIV revealed in a surveillance system transmission network. *Virus Evol*. 2017 Apr 19;3(1):vex008. DOI: 10.1093/ve/vex008. eCollection 2017 Jan. PubMed PMID: 28458918; PubMed Central PMCID: PMC5399924.
 20. Yap SH, Sheen CW, Fahey J, Zanin M, Tyssen D, Lima VD, Wynhoven B, Kuiper M, Sluis-Cremer N, Harrigan PR, Tachedjian G. N348I in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase confers zidovudine and nevirapine resistance. *PLoS Med*. 2007 Dec;4(12):e335. PubMed PMID: 18052601; PubMed Central PMCID: PMC2100143.