



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

**Utilidad de muestras de plasma seco fijado en
papel filtro (DPS) para realizar carga viral y
genotipo de farmacorresistencia en pacientes
con VIH-1/SIDA**

Tesis de Maestría

**Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Médicas
presenta:**

Juan Pablo Rodríguez Auad

Tutor:

Dra. María Rosalía Lira Carmona

Cotutor: QBP. María Teresa Alvarez y Muñoz

México, D.F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Resumen.....	2
Introducción.....	4
Antecedentes.....	10
Justificación.....	12
Hipótesis.....	13
Planteamiento del problema.....	13
Objetivos.....	14
- Objetivo general.....	14
- Objetivos particulares.....	14
Metodología.....	15
- Diseño de estudio.....	15
- Población de estudio.....	15
- Criterios de inclusión.....	15
- Criterios de eliminación.....	15
- Reclutamiento de pacientes.....	15
- Muestras.....	15
- Procedimiento.....	15
Clasificación de las variables.....	21
Definición operativa de las variables.....	21
Análisis estadístico.....	22
Cálculo del tamaño de muestra.....	22
Consideraciones éticas.....	22
Consideraciones de bioseguridad.....	22
Resultados.....	23
Discusión.....	33
Difusión.....	38
Anexos.....	39
Referencias.....	53

RESUMEN

Antecedentes:

La monitorización del tratamiento antirretroviral (ARV) por medio de la cuantificación de la carga viral (CV) e identificación de mutaciones de farmacorresistencia a los medicamentos antirretrovirales no se realiza regularmente en países de bajos recursos, principalmente por problemas de infraestructura laboratorial, como por el costo elevado de estas pruebas. Las muestras de plasma seco fijado en papel filtro (DPS), son una alternativa para ampliar el acceso a estas pruebas en países pobres donde se identifican más del 90% de las nuevas infecciones por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1).

Objetivos:

Evaluar la utilidad de muestras DPS para determinar CV y genotipos de farmacorresistencia en un grupo de pacientes mexicanos infectados con el VIH-1.

Metodología:

Pacientes.- Se incluyeron 34 pacientes con diagnóstico de VIH-1/SIDA.

Muestras.- Los DPS se elaboraron aplicando 50µL de plasma en círculos de 1cm de diámetro de un papel filtro (Schleicher and Schuell 903), que se dejó secar a temperatura ambiente por 2 horas previo a su almacenamiento a -20°C. Estas 34 muestras DPS fueron analizadas en tres etapas. En la primera etapa se estudiaron 13 muestras DPS almacenadas por tiempo prolongado (2 años). En la segunda etapa, para la correlación de la CV y las mutaciones de farmacorresistencia, se estudiaron 17 muestras pareadas en DPS y plasma líquido almacenadas por 7 a 12 días. En estas dos primeras etapas las muestras DPS fueron almacenadas a -20°C previo a su análisis. En la tercera etapa se usaron 4 muestras DPS para evaluar la estabilidad de los ácidos nucleicos en muestras almacenadas a diferentes temperaturas (-20°C, 4°C, temperatura ambiente y 37°C).

Extracción del RNA.- El RNA de las muestras DPS fue extraído usando el procedimiento de NucliSens que se basa en el uso de silicona.

Carga viral.- La CV en el plasma líquido y en muestras DPS se cuantificó usando el ensayo Amplicor HIV-1 Monitor (v1.5, Roche Diagnostics, Branchburg, N.J.).

RT-PCR anidada.- Se hizo una PCR casera anidada que amplificó un fragmento de 1023pb del gen *pol* del VIH-1 que compromete los codones 15-99 de la proteasa (PR) y 1-256 de la transcriptasa reversa (TR).

Secuenciación.- Para la interpretación de genotipos de farmacorresistencia para los antirretrovirales, se hizo el análisis de la secuencia del fragmento de 1023pb usando un secuenciador capilar ABI 3100, usando los primers internos PR/RT.2F y 215/219.3R. Se usó el programa CLC Main Workbench para analizar los datos de las secuencias obtenidas y el programa de Stanford de acceso en línea (<http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>).

Resultados:

En la primera etapa, el promedio de la CV de las 13 muestras en DPS fue de 294.946 copias/mL (5.46log₁₀) y el tiempo promedio de almacenamiento de estas muestras fue de

2 años. En lo referente al éxito en la amplificación de estas muestras, 4/13 (30.7%) amplificaron el fragmento de 1023pb.

En la segunda etapa de las 17 muestras pareadas en DPS y plasma líquido analizadas (total 34 muestras), el tiempo promedio de almacenamiento de estas muestras fue de 7.4 días. La CV promedio en plasma líquido de estas muestras fue de $5.3\log_{10}$, mientras que la CV en DPS fue de $5.0\log_{10}$, con un coeficiente de correlación entre ambas de $r=0.95$. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \Rightarrow 0.05$) entre la amplificación de las muestras en DPS vs las muestras en plasma líquido, lográndose amplificar muestras pareadas en el 58.8% (10/17).

En lo referente a las diferentes temperaturas de almacenamiento estudiadas en 4 muestras, en todas ellas se pudo medir la CV en las cuatro temperaturas, mientras que sólo en dos muestras se amplificó el fragmento de 1023pb a -20°C y temperatura ambiente en la primera; y a 37°C y 4°C en la segunda.

Se obtuvieron 28 amplificados de 1023pb de muestras pareadas DPS y plasma líquido, los cuales fueron secuenciados, obteniéndose 20 secuencias de nucleótidos que fueron analizadas para obtener el genotipo de farmacorresistencia. Todas las muestras secuenciadas fueron del subtipo B del VIH-1 y 40% (8/20) presentaron mutaciones de farmacorresistencia para los inhibidores de la transcriptasa reversa (ITR) y para los inhibidores de la proteasa (IP). En 6 muestras pareadas, se obtuvo secuencias en DPS y plasma líquido, donde se encontró un 100% de correlación entre las mutaciones y el patrón de susceptibilidad a los antirretrovirales en ambos tipos de muestras.

Conclusión

El uso de muestras en DPS es una buena alternativa para monitorizar el tratamiento ARV en pacientes mexicanos que viven con el VIH-1.

Utilidad de muestras de plasma seco fijado en papel filtro (DPS) para realizar carga viral y genotipo de farmacorresistencia en pacientes con VIH-1/SIDA

Introducción

El VIH produce una de las infecciones más severas nunca antes conocida que ha atacado a la población humana, especialmente al grupo de edad económicamente productivo comprendido entre los 15-49 años.¹ Observaciones sobre la historia natural de la enfermedad han mostrado que usualmente ésta es letal para aquellos que están infectados con el VIH.² No existe cura ni tampoco vacunas disponibles,³ sin embargo el tratamiento antirretroviral (ARV) ha transformado al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) de una condición fatal e inevitable a una enfermedad crónica y manejable en algunos aspectos.⁴

Cada día, más de 6.800 personas se infectan con el VIH y más de 5.700 mueren, la gran mayoría por no tener acceso a medidas de prevención, tratamiento y/o atención médica. A pesar del progreso sobre el VIH en la última década, la pandemia de VIH continúa siendo un reto de salud pública dentro del grupo de enfermedades infecciosas.⁵

El número de personas que viven con VIH continúa creciendo, estimándose en 33.4 millones (31.1-35.8 millones) para el año 2008, año en el cual ocurrieron 430.000 nuevas infecciones en niños menores de 15 años, la gran mayoría de éstas por transmisión in útero, durante el parto o en el periodo postnatal como resultado de la lactancia.⁶

RESUMEN GLOBAL DE LA EPIDEMIA DEL SIDA

Número de personas viviendo con VIH	
Total	33.4 millones [31.1 millones–35.8 millones]
Adultos	31.3 millones [29.2 millones–33.7 millones]
Mujeres	15.7 millones [14.2 millones–17.2 millones]
Niños menores de 15 años	2.1 millones [1.2 millones–2.9 millones]
Personas nuevamente infectadas con VIH	
Total	2.7 millones [2.4 millones–3.0 millones]
Adultos	2.3 millones [2.0 millones–2.5 millones]
Niños menores de 15 años	430.000 [240.000–610.000]
Muertes relacionadas al SIDA	
Total	2.0 millones [1.7 millones–2.4 millones]
Adultos	1.7 millones [1.4 millones–2.1 millones]
Niños menores de 15 años	280.000 [150.000–410.000]

AIDS epidemic update : Noviembre 2009.

En México, el número de personas que viven con VIH es de 200.000 (150.000 – 310.000), siendo la prevalencia en adultos de 15 a 49 años de 0.3% (0.2% - 0.5%), estimándose un total de 11.000 (5.700 – 18.000) defunciones debidas al SIDA.⁶ En lo referente a la terapia ARV en los siguientes cuadros se resumen los datos obtenidos en México:

Número estimado de personas que reciben terapia ARV

	2004	2005	2006	2007
Ambos sexos	29.000	31.000	39.000	43.000

Fuente: UNAIDS/WHO, 2008

Número estimado de personas que requieren terapia ARV

	2004	2005	2006	2007
Ambos sexos	64.000	68.000	72.000	76.000

Fuente: UNAIDS/WHO, 2008

Cobertura estimada de terapia ARV (%)

	2004	2005	2006	2007
Ambos sexos	45	45	54	57

Fuente: UNAIDS/WHO, 2008

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

Hay dos tipos de VIH (VIH-1 y VIH-2) que muestran aproximadamente 40-60% de homología de aminoácidos. El VIH infecta a varios tipos de células que expresan el receptor celular CD4+, estas incluyen principalmente a las células T ayudadoras (células T CD4+ o células T4), así como otras células blancas, incluyendo monocitos y macrófagos. Las células gliales en el sistema nervioso central, células cromafines en el intestino y células de Langherhans en membranas mucosas y piel que expresan el receptor CD4+ pueden también ser infectadas por el VIH.^{7,8}

El VIH es un retrovirus de RNA que está constituido por una envoltura externa o cubierta compuesta por una doble capa lipídica que contiene numerosas espículas. Cada una de estas espículas está compuesta de cuatro moléculas de glucoproteína 120 (gp120) y el mismo número de gp41 incrustadas en la membrana. Debajo de la envoltura se encuentra una capa de proteínas de la matriz que rodean la cápside (core). La cápside que tiene forma de cono está compuesta de otra proteína, la p24, esta cápside contiene en su interior el material genético del VIH, el cual consiste de dos hebras de RNA con cerca de 9.200 bases nucleótidas, donde se encuentran otras proteínas como la integrasa, proteasa (PR), ribonucleasa, y otras dos proteínas (p6 y p7) que se encuentran en el interior de la cápside.^{9,10,11} (Fig.1).

El genoma del VIH codifica una enzima inusual llamada transcriptasa reversa (TR) que a nivel del citoplasma permite al ácido desoxirribonucleico (DNA) ser transcrito a partir del RNA, esta doble hebra de DNA del virus migra hacia el núcleo donde se inserta en el DNA del huésped y se transforma en provirus, de esta manera la infección en la célula es permanente y el VIH puede producir copias de su propio genoma lo que conlleva a la elaboración de un vasto número de partículas virales que infectan a otras células.¹²

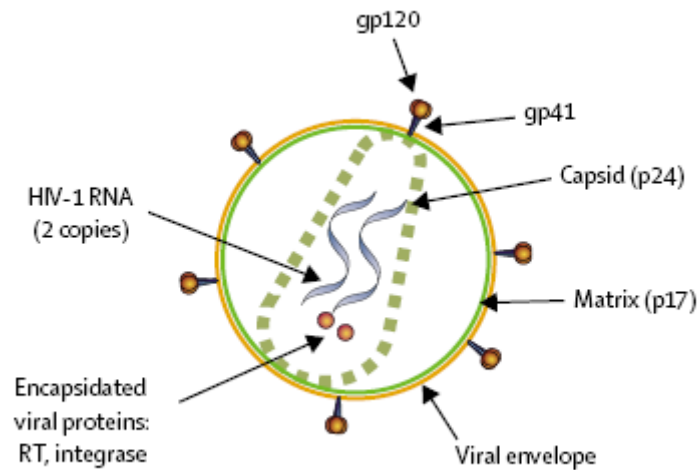


Fig.1 Estructura del VIH

Todos los retrovirus tienen una estructura homogénea y contienen los mismos tres genes, *gag*, *pol* y *env*, que codifican las proteínas estructurales y las enzimas usadas en el ciclo de la replicación. La función de cada gen no está del todo comprendida, el gen *gag* puede dirigir la formación de partículas virales ante la ausencia de los genes *pol* y *env*, y cuando este no es funcional el VIH pierde su habilidad de migrar fuera de la célula huésped. El gen *pol* codifica la TR, PR, ribonucleasa e integrasa, esta última corta el DNA de la célula e inserta el DNA del VIH. El gen *env* codifica las proteínas de envoltura, gp120 y gp41.

HIV-1 Gene Map

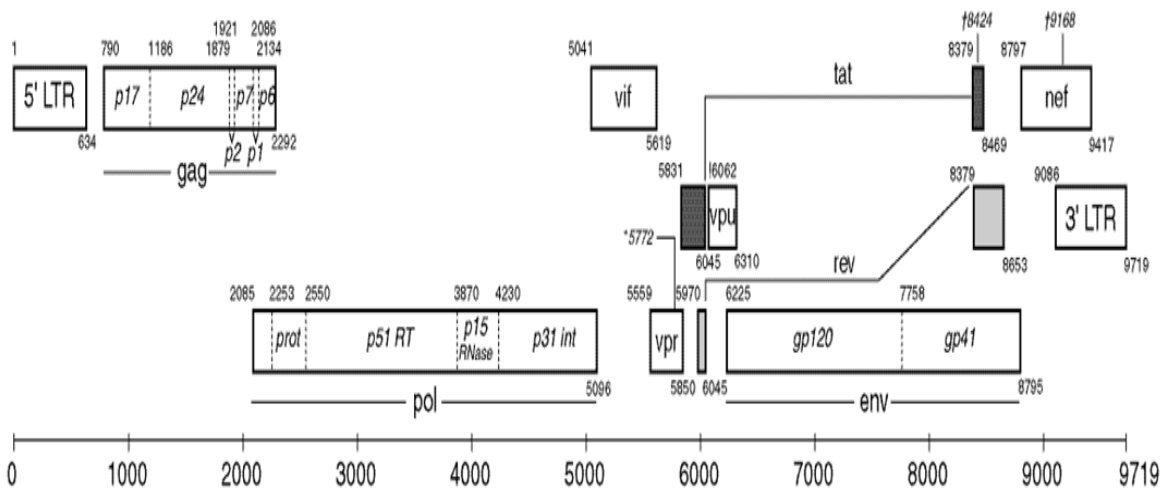


Figura 2. Esquema del genoma del VIH-1

Otros genes como el gen *tat* produce proteínas regulatorias que favorecen la transcripción del provirus del VIH. El gen *nef* puede modificar las células para hacerlas capaces de crear viriones del VIH. Las largas terminaciones de nucleótidos repetidos (LTR) no son parte de las 9.200 bases del genoma del VIH, pero contienen secuencias que ayudan a los genes reguladores a controlar la expresión de los genes *gag-pol-env*. Por ejemplo el gen *vif* se requiere para completar la transcripción reversa del RNA viral a DNA del VIH, el gen *vpu* favorece la presentación del VIH fuera de la célula y el gen *vpr* está relacionado con la migración del DNA viral citoplasmático dentro del núcleo.¹⁵

Células infectadas con el VIH contienen de 400.000 a 2.500.000 de copias del RNA viral por célula. El RNA viral puede usar hasta un 40% del total de la síntesis de proteínas para la producción de proteínas virales, observándose una elevada cantidad de RNA viral y síntesis de proteínas previo a la muerte de la célula.¹⁶ Dado que una sola célula infectada del VIH puede producir miles de copias, algunas de estas pueden tener errores (mutaciones). Algunas de estas mutaciones pueden ser copias inactivas, otras pueden ser mutantes del VIH las cuales aumentan la sobrevivencia y/o la habilidad de replicación del virus. Con el tiempo estas mutaciones son transmitidas a otros individuos donde se producen más mutaciones que pueden llevar a la evolución de nuevas cepas variantes del virus. La diversidad genética del VIH lleva a la resistencia a los medicamentos y a la evasión de la respuesta inmune, haciendo que el desarrollo de una vacuna sea un reto.¹⁷ El alto grado de mutación resulta en la producción de virus que no son susceptibles a la terapia medicamentosa,¹⁸ por otro lado la terapia medicamentosa refuerza la selección positiva y la generación de diversidad genética en el VIH. Esta diversidad genética hace extremadamente difícil desarrollar una droga que pueda matar a todos los virus del VIH.¹⁹

Tratamiento ARV y farmacoresistencia

En esta década, ha habido un incremento sin precedentes en el acceso al tratamiento ARV en sitios de recursos limitados donde previamente era inaccesible. Entre el año 2003 y el 2008 aproximadamente 4 millones de personas de países de bajo y mediano ingreso estuvieron recibiendo terapia ARV, lo que equivale a un incremento de 10 veces en los últimos cinco años. La cobertura de la terapia ARV se incrementó de 7% en el 2003 a 42% en el 2008, principalmente en el sur de África (48%). En países con altos recursos donde los medicamentos ARVs han estado ampliamente disponibles, el acceso al tratamiento ha tenido un extraordinario impacto en la mortalidad relacionada al VIH y en la longevidad,²⁰ por ejemplo en Brasil, donde la terapia ARV es gratuita desde 1996, el seguimiento de la supervivencia al diagnóstico de SIDA se incrementó de 4 meses entre 1992-1995 a 50 meses entre 1998-2001.²¹ En un estudio de cohorte prospectivo en Uganda, la combinación de medicamentos ARVs y trimetoprim/sulfametoxazol redujo la mortalidad en 95% en comparación con ninguna intervención.²² En niños, el diagnóstico temprano y la terapia ARV redujeron la mortalidad en un 76% y disminuyeron la progresión de enfermedades relacionadas al VIH en un 75% en dos centros médicos de Sudáfrica.²³ Aproximadamente 2.9 millones de vidas se han salvado gracias al acceso a la

terapia ARV, la gran mayoría de estas fueron en los países desarrollados antes del 2004.²⁴

En la actualidad, un total de 25 medicamentos ARVs han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el uso de pacientes adultos y adolescentes infectados por el VIH; de estos, 17 han sido aprobados para pacientes pediátricos.²⁵ Estos medicamentos se incluyen en cinco grupos: inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa (INTR), inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa (INNTR), inhibidores de la proteasa (IP) inhibidores de entrada y de fusión (IEF) y los inhibidores de la integrasa (II).²⁶ (Fig.3). La ocurrencia de mutaciones de farmacorresistencia es inevitable para casi todos los medicamentos ARVs disponibles. Al momento, la farmacorresistencia es una de las mayores causas de falla al tratamiento ARV y es también un gran reto para el tratamiento del SIDA en todo el mundo.²⁷ Por ejemplo, los INTR después de transformarse en formas activas de trifosfato, compiten con los nucleótidos naturales en su unión e incorporación con la cadena viral nascente, sin embargo hasta ahora para cada inhibidor de la TR usados en el tratamiento del SIDA, el virus ha desarrollado mecanismos de resistencia. Esto se debe a la predisposición natural al error de la TR, la cual se debe en parte a la ausencia de actividad 3' 5' de corrección.^{28,29}

La terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) se ha asociado a una mejoría significativa en lo referente a la morbilidad y mortalidad de los pacientes infectados con VIH-1, sin embargo, es bien conocido que el elevado número de mutaciones del VIH-1 en presencia de TARAA se asocia con farmacorresistencia y disminución de la eficacia del tratamiento, además la replicación viral bajo una presión medicamentosa selectiva lleva inevitablemente a resistencia medicamentosa y a resistencia cruzada, disminuyendo las opciones terapéuticas, lo que anticipa que la resistencia a medicamentos es y continuará siendo un asunto muy importante en el tratamiento eficaz de la infección por el VIH.^{30,31} En un estudio realizado en China, donde se incluyeron 718 pacientes con VIH, se observó que la prevalencia de mutaciones de farmacorresistencia fue de 37.8%, alta frecuencia de mutaciones se observaron en el grupo de pacientes tratados con ARVs y en el grupo que presentó abandono al tratamiento en comparación con los pacientes vírgenes al tratamiento.³² La falla terapéutica se debe a varios factores como falta de potencia de la combinación, insuficiente apego a los medicamentos, transmisión de virus farmacorresistentes que resulta en una supresión incompleta de la replicación viral.³³

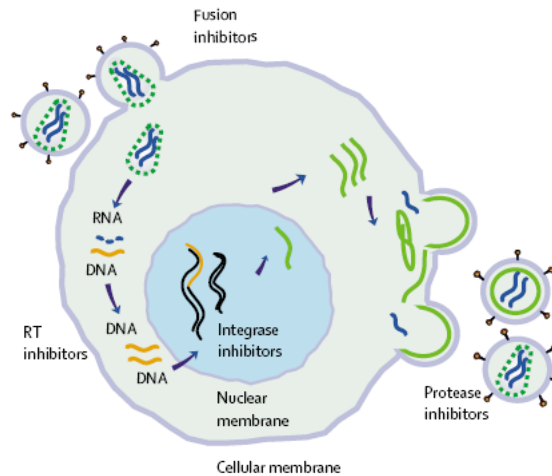


Fig.3 Sitios de acción de los medicamentos antirretrovirales

Monitorización del tratamiento ARV

En pacientes con VIH que reciben tratamiento ARV se debe monitorizar la respuesta al mismo y la progresión de la enfermedad. Generalmente esta monitorización se realiza por medio de la cuantificación de las células T CD4+, así como por las mediciones de la carga viral (CV), la cual mide el número de copias de RNA del VIH por mililitro (mL) de plasma. Muchos países en vías de desarrollo, no tienen adecuados recursos que les faciliten monitorizar de manera rutinaria marcadores de laboratorio sobre la actividad de la enfermedad. Mientras que los medicamentos ARVs se han incrementado en África y en otros países en vías de desarrollo, éste no se ha acompañado de un adecuado fortalecimiento de la capacidad del laboratorio. La monitorización del tratamiento con CV del VIH y pruebas de resistencia como se recomienda en países industrializados es raramente disponible en lugares con recursos limitados debido al alto costo y requerimientos rigurosos de almacenamiento y transporte de las muestras. Consecuentemente, la falla terapéutica pasa usualmente inadvertida hasta que graves síntomas se presentan, cuando se han acumulado mutaciones de resistencia y son requeridos medicamentos de segunda línea.³⁴

Otro punto importante en la monitorización, es la realización de pruebas de resistencia a los ARVs. La resistencia del VIH a los ARVs se define como la replicación viral activa en presencia de niveles terapéuticos de uno o más medicamentos. La resistencia genotípica se refiere a las mutaciones en la secuencia del gen blanco de los ARVs (TR o PR) que se asocian a mayor capacidad de replicación viral. La resistencia a los ARVs es originada por la gran replicación viral existente (cerca de 10 billones de viriones producidos por día) en presencia de una enzima TR defectuosa que comete un error de copia del genoma viral cada vez que hace una nueva copia. Se calcula que cada día se genera al azar al menos una cepa con una mutación asociada a resistencia a los ARVs.³⁵ Existen en el mercado

métodos comerciales que se usan para detectar mutaciones genómicas del VIH las cuales confieren resistencia a tipos específicos de medicamentos ARVs, por ejemplo en el caso del método comercial *ViroSeq HIV-1 Genotyping System*, este se puede usar para detectar resistencia del subtipo B del VIH-1 en muestras de plasma recolectadas en EDTA con un rango de CV de 2.000 a 750.000 copias/mL y genotipificar todo el gen de la PR desde los codones 1 a 99 y tres cuartas partes del gen de la TR a partir de los codones 1 a 335. Las principales indicaciones de uso de estos sistemas son para el seguimiento de pacientes infectados con el VIH-1 que presentan falla terapéutica (con incremento de la CV) previo al cambio de manejo ARV, monitorizar el tratamiento en mujeres embarazadas, así como para determinar los genotipos de farmacorresistencia en pacientes con reciente diagnóstico de VIH-1 previo al inicio de la terapia ARV. Un factor clave para identificar nuevas estrategias de tratamiento es el conocimiento de los genotipos de resistencia del virus debidas a mutaciones presentes en el genoma viral. Estudios retrospectivos y prospectivos basados en intervención han demostrado la utilidad clínica de las pruebas de farmacorresistencia.³⁶

Antecedentes

Muestras de sangre seca fijadas en papel filtro.

La muestra que se considera estándar de oro para la medición de la CV del VIH-1 y determinación de genotipos de farmacorresistencia es el plasma líquido, para lo cual los pacientes tienen que acudir a centros de salud para la toma de muestra de sangre la cual se transporta a laboratorios de referencia. Este método requiere varios mL de sangre tomados por venopunción, separación del plasma de las células y criopreservación, además de su transporte en congelación. En nuestro país se recomiendan realizar pruebas de resistencia a los ARVs al inicio del tratamiento, durante el embarazo y cuando se realiza cambio de esquema terapéutico por falla virológica,³⁵ en muchos casos estas pruebas no se realizan por el alto costo de estos métodos comerciales de genotipificación no sólo en nuestro país sino también en muchos países con recursos limitados, sobre todo en áreas rurales remotas.³⁷ Reconocida la importancia de medir la CV del VIH-1 y determinar los genotipos de farmacorresistencia del virus para monitorizar el tratamiento ARV, se ha tratado de ampliar esta cobertura en países de bajos recursos por medio de muestras de sangre en papel filtro. Cualquier componente de la sangre (suero, plasma o sangre entera) puede ser usado en el papel filtro (DSS: *dried serum spot*, DPS: *dried plasma spot* o DBS: *dried blood spot* respectivamente) para estos fines. Las muestras en DBS han sido el tipo de muestra que se ha usado más ampliamente. En diferentes estudios se ha observado que el uso del papel filtro es un método útil para medir CV del VIH-1 en pacientes que viven en regiones remotas,^{38,37} de donde se pueden trasladar dichas muestras a laboratorios de referencia dentro del mismo país o incluso ser enviadas a otros países para su análisis. Se ha observado que la estabilidad del RNA del VIH-1 en DBS puede durar hasta 1 año o más a temperatura ambiente o a -70°C.³⁹ En el campo, la muestra en papel filtro tiene ventaja sobre la muestra de plasma líquido, ya que la

cantidad de sangre requerida es menor, se puede tomar con lanceta, el plasma no requiere ser separado (en el caso de muestras DBS) y el requerimiento de centrifugación y electricidad es menor, por otro lado, no se requiere refrigeración para guardar y transportar las muestras y el papel filtro puede ser guardado en lotes y enviados a los laboratorios centrales a temperatura ambiente para su procesamiento. Además se puede extraer el RNA del papel filtro, el cual puede usarse posteriormente para amplificar un determinado fragmento del genoma del virus, para la secuenciación, la subtipificación y genotipificación. Estas ventajas refuerzan el valor de los métodos de recolección de campo para investigar la historia natural de la enfermedad del VIH-1, transmisión perinatal, estudios epidemiológicos, monitorización del tratamiento, evolución de la enfermedad, y estudios de intervención como vigilancia longitudinal de farmacorresistencia.⁴⁰ Iniciativas para contar con pruebas de farmacorresistencia antes y/o durante el tratamiento ARV son fundamentales para prevenir problemas asociados con la emergencia y transmisión del VIH-1 farmacorresistente.⁴¹

Las muestras en papel filtro son recolectadas colocando sangre, plasma o suero en el papel filtro, (Fig. 4) se toma la muestra ya sea de sangre venosa tomada por punción periférica o directamente de punción del dedo en caso de muestras DBS, haciendo de este método conveniente en zonas rurales. Las muestras DPS se recolectan de la misma manera con la única diferencia que se centrifuga la muestra de sangre previamente para separar el plasma de las células. Las muestras en papel filtro pueden ser almacenadas en bolsas de plástico con desecante y enviadas a temperatura ambiente, así se evita la necesidad de cadena de frío y el envío inmediato al laboratorio. El costo consumible para las muestras en papel filtro son menores a un dólar por prueba, y los costos de transporte son notoriamente reducidos comparados con el plasma líquido.⁴² En lo referente al tiempo y temperatura ideal de almacenamiento de las muestras en papel filtro, existen pocos datos al respecto y algunos contradictorios, por ejemplo estudios previos han mostrado una pérdida significativa del RNA del VIH-1 después de 1 a 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente,^{43,44} mientras que otro estudio multicéntrico³⁹ en Norte América encontró estabilidad del RNA del VIH-1 en DBS almacenado a temperatura ambiente por un año. En lo referente a las pruebas de resistencia usando papel filtro, un estudio reciente muestra que la genotipificación fue altamente eficiente en muestras DBS almacenadas a 4°C por un año,⁴⁵ aunque el almacenamiento en condiciones extremas (37°C y 100% de humedad) resultaron en un rápido descenso en la eficacia de la genotipificación.⁴⁶

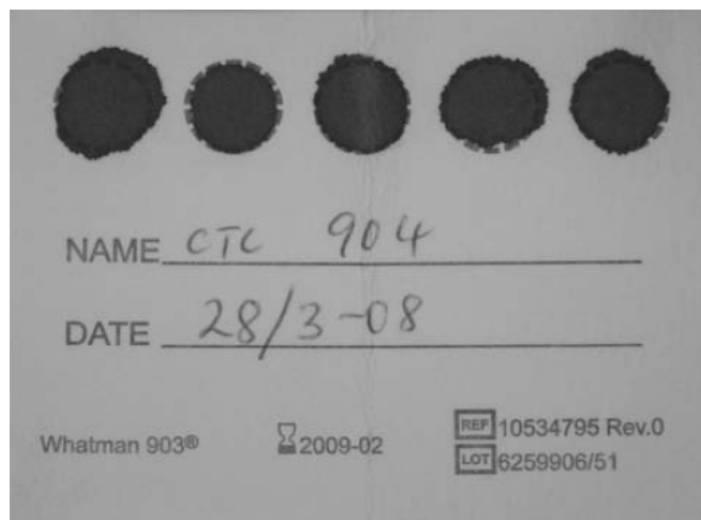


Fig.4 Muestra de sangre en papel filtro Whatman 903.

No sólo la facilidad y seguridad del transporte en papel filtro combinada con la marcada estabilidad del RNA son factores importantes, sino también su equivalencia biológica entre muestras de plasma líquido y de plasma en papel filtro. Mwaba et al.⁴⁷ demostraron que la medición de la CV del VIH-1 en DBS correlaciona bien con aquellas tomadas en DPS. En México se han realizado estudios usando DBS para medición de CV⁴⁸ y para determinación de genotipos de farmacorresistencia,^{49,50} no existen estudios previos en México usando muestras DPS.

En los últimos años, se han hecho inmensos esfuerzos y dado recursos para el incremento global del tratamiento ARV en sitios de bajos recursos. Se redujo el precio de los ARVs de más de 10.000 dólares a menos de 100 dólares por persona por año, desafortunadamente los programas de tratamiento no se han acompañado de un fortalecimiento en la capacidad del laboratorio.⁵¹ Mientras que los precios de los medicamentos ARVs disminuyeron dramáticamente debido a la competencia de genéricos, el costo del equipamiento del laboratorio necesario para monitorizar el tratamiento ha permanecido elevado. Desafortunadamente en México como en otros países en vías de desarrollo no están disponibles herramientas adaptadas al campo para la monitorización virológica con el fin de conocer la CV y genotipos de farmacorresistencia. Es por esto que la tremenda victoria en el tratamiento del VIH en los últimos años se puede perder por la falta de una adecuada monitorización del mismo.

Justificación

El desarrollo de las metodologías de biología molecular ha permitido conocer el genoma del VIH-1, lo que ha favorecido el desarrollo de fármacos que contrarrestan la replicación viral, los cuales no son efectivos durante todo el desarrollo de la infección, porque el VIH tiene una alta tasa de mutaciones y su polimerasa no tiene la capacidad de corregir los errores cometidos durante su replicación. Bajo este contexto, es muy importante analizar

el genoma del virus que se encuentra en el organismo durante el desarrollo de la infección para detectar mutaciones en regiones específicas del genoma viral y proporcionar información sobre el/los medicamento/s que deben suministrarse al paciente, ayudando al médico a tomar la mejor decisión sobre el tratamiento correcto para proporcionar una mejor calidad de vida para cada paciente en particular. Así de importante como lo es la determinación de mutaciones de farmacorresistencia, lo es la medición de la CV del VIH-1 ya que este es un dato objetivo de la respuesta al tratamiento y evolución de la enfermedad, lo que permite modificaciones en el tratamiento, reforzamiento del apego al mismo y decisiones médicas según el grado de inmunosupresión observado de manera indirecta con los niveles de CV.

Por otro lado la inadecuada infraestructura del laboratorio para realizar estas pruebas en países de bajos recursos, así como la dificultad y el alto costo de trasladar las muestras de plasma en red fría dificultan aún más la realización de la CV y de los genotipos de farmacorresistencia. Es en este sentido que nos propusimos evaluar la utilidad de muestras DPS para medir la CV y determinar genotipos de farmacorresistencia de pacientes con VIH-1, y al mismo tiempo evaluar las condiciones y el tiempo adecuados de almacenamiento de las muestras DPS con el fin de proponer el método para la recolección y el traslado de estas muestras a laboratorios centrales de referencia nacional donde se puedan llevar a cabo el análisis de estas muestras.

El uso de las muestras en DPS permitirá el traslado de las muestras de una manera más segura y con menos costos sin la necesidad de una red de frío para su transporte, lo que permitirá que se puedan llevar a cabo el análisis tanto de CV como de los genotipos de farmacorresistencia en un mismo tipo de muestra (plasma seco). Las muestras DPS tienen la ventaja de poder ser almacenadas para realizar un estudio de genotipo de resistencia posterior o histórico cuando el paciente necesite del resultado, como en el caso de una falla terapéutica.

Hipótesis

Las muestras DPS son tan útiles como las de plasma líquido para determinar CV y genotipos de farmacorresistencia en pacientes con VIH/SIDA.

Planteamiento del problema:

El uso del tratamiento ARV se ha incrementado en todo el mundo lo que ha llevado a la emergencia de farmacorresistencia del VIH. Si bien actualmente existen métodos comerciales para la medición de CV y determinación de genotipos de farmacorresistencia en el VIH, estas pruebas son de costo elevado y de difícil acceso en países con bajos recursos, los cuales albergan a la gran mayoría de pacientes infectados por el virus. Es en este sentido que la determinación de los genotipos de farmacorresistencia en estos países es fundamental para el diagnóstico de mutaciones de resistencia, así como para la elección del mejor régimen terapéutico previo al inicio del mismo y para el seguimiento del tratamiento.

En países desarrollados, pacientes que reciben tratamiento ARV son regularmente monitorizados con mediciones de CV y determinación de genotipos de farmacorresistencia. En el resto de los países esto no ocurre principalmente porque las pruebas de farmacorresistencia son caras, técnicamente complejas e inaccesibles para la gran mayoría de individuos infectados por el VIH, por lo que están raramente disponibles debido a la complejidad del procedimiento y los estrictos requerimientos de almacenamiento y transporte de las muestras de plasma.

Una detección temprana de falla terapéutica seguida de un cambio temprano del tratamiento con un esquema de segunda línea es fundamental para prevenir la acumulación de mutaciones de farmacorresistencia, y hacer efectiva la supresión de la replicación del virus evitando las consecuencias negativas de la infección por el VIH. Es así que una vez que un paciente ha iniciado tratamiento ARV, es comúnmente imposible determinar si el tratamiento está siendo efectivo o no. Bajo este contexto surge la pregunta de: ¿cómo se puede monitorizar la CV y los genotipos de farmacorresistencia en sitios con bajos recursos y pobre infraestructura laboratorial?

Una estrategia alternativa es el envío de muestras desde clínicas periféricas a laboratorios centrales por medio de una toma de muestra sencilla, rápida y económica que incremente la relación costo-beneficio de manera importante para el paciente y la institución que se encargue del mantenimiento de su salud.

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la utilidad de muestras DPS para realizar CV y genotipos de farmacorresistencia en un grupo de pacientes infectados por el VIH-1.

Objetivos particulares:

- Comparar la CV de muestras DPS y plasma líquido.
- Determinar la estabilidad de los ácidos nucleicos extraídos de muestras DPS sometidas a diferentes temperaturas de almacenamiento.
- Amplificar y secuenciar por RT-PCR una región del gen de la PR y otra de la TR del VIH-1.
- Identificar las mutaciones asociadas a farmacorresistencia y determinar el genotipo de farmacorresistencia del virus de las muestras.
- Correlacionar los genotipos de farmacorresistencia obtenidos en DPS y en plasma líquido.

Metodología

Diseño de estudio

Estudio transversal comparativo.

Población de estudio

Se incluyeron 34 muestras de sangre de pacientes adultos (mayores de 18 años) con diagnóstico de infección por VIH/SIDA, los cuales se encontraban recibiendo tratamiento ARV, y acudían para toma muestra de sangre para la medición de CV en plasma líquido para el seguimiento de su tratamiento.

Criterios de inclusión

Muestras de sangre de pacientes adultos con diagnóstico de infección por VIH/SIDA, que se encontraban recibiendo tratamiento ARV y que aceptaron participar en el estudio.

Criterios de eliminación

Muestras contaminadas o almacenadas inadecuadamente.

Reclutamiento de pacientes

Se reclutaron pacientes provenientes de la clínica de hepatitis del Hospital de Infectología del CMN La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con diagnóstico de infección por VIH/SIDA con tratamiento ARV y que acudieron para toma de muestra de rutina para medición de CV del VIH-1, y a quienes se les invitó a participar en el estudio por medio de un consentimiento informado (Anexo 1), donde se les informó el objetivo del estudio y los pasos a seguir posterior a la toma de la muestra sanguínea.

Muestras

A los pacientes con VIH-1/SIDA que ingresaron al estudio, se les tomó una muestra de sangre por punción venosa en 2 tubos con anticoagulante (EDTA) (5 mL de sangre por tubo aproximadamente). Las muestras de sangre se centrifugaron a 3.000 rpm, a 4°C y por 30 min para separar el plasma de las células sanguíneas. El plasma se separó de las células sanguíneas dentro de las 6 primeras horas de obtenida la muestra y se congeló a -70°C, hasta su uso.

Procedimiento

Preparación de DPS.

El plasma líquido congelado a -70°C fue descongelado y se procedió a aplicar 50 uL de plasma líquido en cada círculo de papel filtro (Schleicher and Schuell 903, Keene. NH, USA) que consiste en un rectángulo o cartilla de 8x5 cm, con 6 círculos de 1 cm de diámetro cada uno. Se prepararon 2 cartillas (12 círculos) por paciente, para desarrollar

los ensayos de CV y genotipos de farmacorresistencia, y para la formación de un banco de muestras, que permitirá hacer estudios retrospectivos y prospectivos en un futuro. Una vez elaborados los DPS se secaron a temperatura ambiente durante dos horas y se introdujeron en bolsas de plástico cerradas herméticamente junto a una bolsa de desecante para evitar la humedad. Una vez guardado el papel filtro en su bolsa respectiva, se almacenó a -20°C previo a su uso.

Elaborados los DPS, el plasma líquido sobrante y correspondiente a los DPS del mismo paciente se almacenó a -70°C para su posterior uso para la medición de CV y genotipos de farmacorresistencia para poder comparar los resultados obtenidos en los DPS con los resultados obtenidos en plasma líquido, muestra que es considerada el estándar de oro para medir la CV y realizar los genotipos de farmacorresistencia.

Todas las muestras se manipularon dentro de una campana de seguridad biológica grado II, y todo el material empleado en la manipulación de las muestras en papel filtro fue nuevo, estéril y libre de enzimas capaces de degradar a los ácidos nucleicos.

Extracción de ácidos nucleicos en DPS

Para la extracción del RNA del VIH-1 se usó la metodología de Nuclisens que consiste en la elución del RNA del VIH-1 a partir de muestras DPS en una solución amortiguadora (que contiene un agente caotrópico, tiocianato de guanidina, y detergente, Tritón X-100, inhibidores de RNAsas y estabilizadores de ácidos nucleicos), este buffer de lisis (Nuclisens) rompe a las células y libera sus componentes. Se usaron 2 círculos de papel filtro (100uL en total), los cuales fueron cortados con tijeras estériles y depositados en el buffer de lisis para dejarlos en agitación cubiertos con papel aluminio durante 1 hora, para el resto del procedimiento se siguieron los pasos de la metodología de NucliSens (Anexo 3), obteniendo un volumen final de 40-45uL de RNA del VIH-1, a partir de los cuales se hicieron alícuotas de 10uL para su uso en la medición de la CV y posterior síntesis de cDNA y amplificación por PCR para realizar la secuenciación e identificación de mutaciones de farmacorresistencia.

Extracción de ácidos nucleicos de plasma líquido

Del plasma líquido almacenado a -70°C se procedió a la extracción del RNA del VIH-1 con la ayuda del kit QIAamp Ultrasens Virus de Qiagen siguiendo las instrucciones del proveedor. (Anexo 3)

Determinación de CV de muestras pareadas en DPS y en plasma líquido

Tanto el RNA extraído a partir de los 2 círculos de DPS, como el RNA extraído de las muestras de plasma líquido fueron usados para cuantificar la CV del VIH-1, para esto se usó el kit Cobas Amplicor HIV-1 MonitorTM Test, version 1.5 (Roche Diagnostics, IN, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor (Anexo 2). Cabe hacer notar en este punto, que para la extracción del RNA se usaron 100uL de plasma en el caso de los DPS y 500uL en el caso del plasma líquido, por lo que para poder comparar los valores de CV entre las

muestras DPS vs plasma líquido se multiplicó por 5 los resultados obtenidos en DPS con el objetivo de hacer equivalentes los volúmenes de ambas muestras para su comparación.

Amplificación por RT-PCR de regiones de la PR y la TR del VIH-1 en DPS y plasma líquido.

Se usaron 10uL de RNA del VIH-1 de las muestras DPS y de plasma líquido para la síntesis de cDNA y para la amplificación de un fragmento del gen *pol*, que compromete regiones de la PR y la TR del VIH-1, para este fin se utilizaron primers ya reportados en un estudio previo⁶⁹ (Anexo 3). Se hizo una PCR anidada para amplificar un fragmento de 1096pb cuyo templado posteriormente fue usado para obtener el fragmento final de 1023pb. Para la preparación de la reacción de síntesis de la primera cadena o cDNA se usó por cada reacción, 10uL del RNA extraído para completar un volumen final de 25uL usando para este fin 5uL de Buffer RT, 2.5uL de dNTPs, 0.5uL del inhibidor de ribonucleasa, 0.5uL de AMV RT, 1uL de oligodT y 5.5uL de agua inyectable. Una vez elaborado el cDNA se procedió a realizar una dilución 1:4 del mismo para usar este cDNA para la primera reacción de PCR para amplificar el fragmento de 1096pb, la cual se realizó usando 10uL de cDNA (dilución 1:4), 2.5uL de Buffer New England, 0.5uL del primer ProOut.3F, 0.5uL del primer RTgen.4R, 0.5uL de la enzima Taq DNA pol y 11uL de agua inyectable por reacción, para completar un volumen final de 25uL. Las condiciones de esta primera PCR fueron: desnaturalización a 94°C por 15 segundos, alineamiento a 50°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Para realizar la segunda PCR o PCR anidada con el objetivo de amplificar el fragmento de 1023pb se hicieron varias diluciones del templado de 1096pb (1uL concentrado, 1uL dilución 1:10, 1uL dilución 1:100, 4uL dilución 1:10 y 4uL dilución 1:100). Se usaron 0.5uL de dNTPs, 1.6uL de MgCl₂, 2.5uL de Buffer New England, 0.5uL del primer PR/RT.2F, 0.5uL del primer 215/219.3R, 0.5uL de la enzima Taq DNA pol y 14.9uL de agua inyectable por reacción. Las condiciones de esta segunda PCR anidada fueron las mismas que la primera PCR a excepción del alineamiento que se realizó a 57°C por 30 segundos.

Los pares de oligonucleótidos que se usaron para amplificar estos fragmentos fueron:

<p>1ra PCR</p> <p>1096pb</p>	<p>2da PCR</p> <p>1023pb</p>
<p>Sentido: Pro-Out.3F: 5'-CCT CAG ATC ACT CTT TGG CAA CG -3'</p> <p>Antisentido: RT gen.4R: 5'-ATC CCT GCA TAA ATC TGA CTT GC -3'</p>	<p>Sentido: PR/RT.2F: 5'-GAT CAC TCT TTG GCA ACG ACC CAT -3'</p> <p>Antisentido: 215/219.3R: 5'-CTT CTG TAT GTC ATT GAC AGT CC -3'</p>

Los detalles de estas reacciones se describen en el anexo 3.

Gel de agarosa y electroforesis Se observó la amplificación del fragmento de 1023pb por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a una concentración de 1ug/uL.

Purificación, cuantificación y secuenciación del fragmento de 1023pb

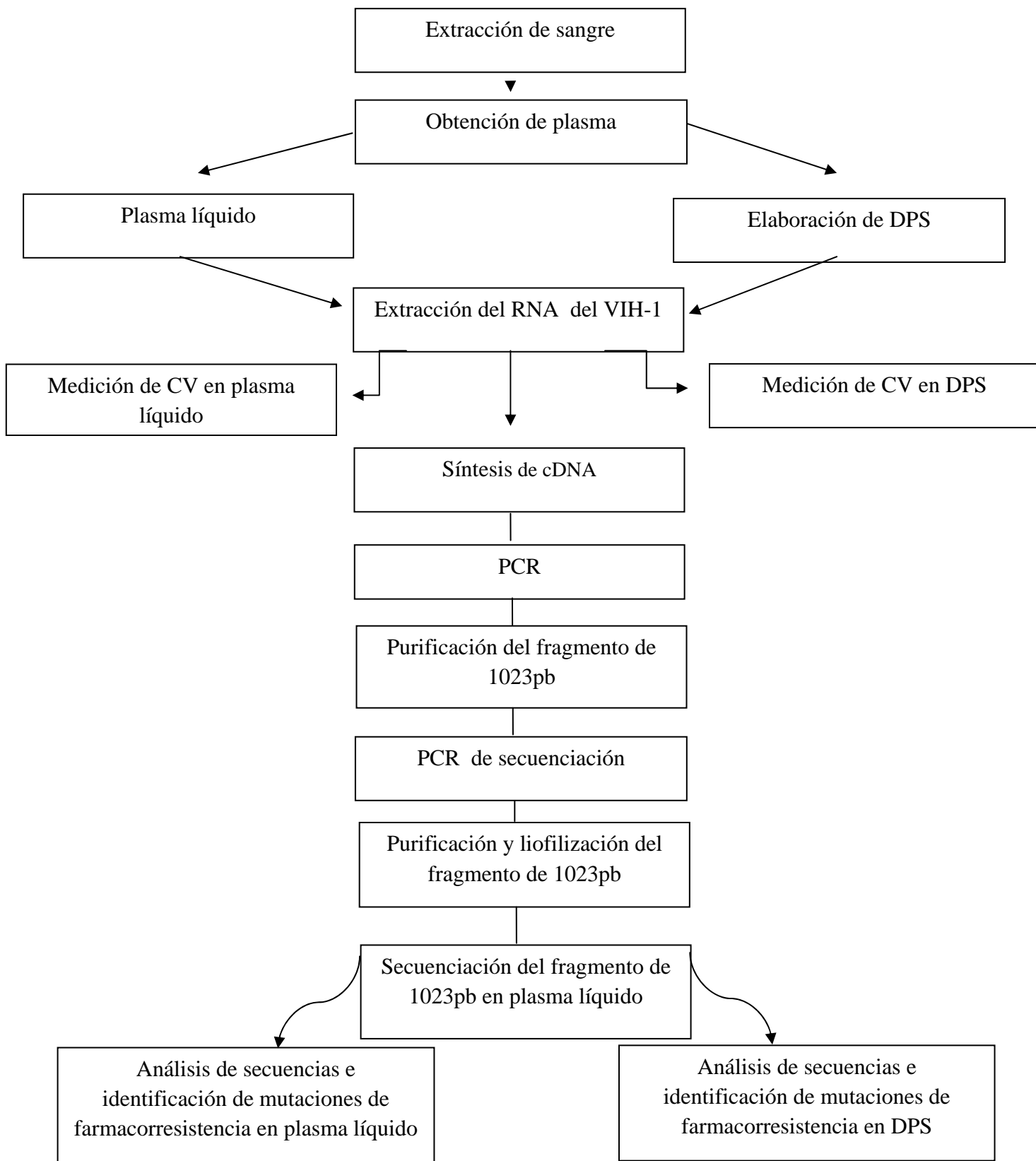
El producto de 1023pb amplificado a partir de la segunda PCR fue purificado usando el método de Pure Link kit™ Invitrogene y el kit QIAquick gel Extraction (QIAGEN), para posteriormente cuantificar en el espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000. Thermo Scientific Wilmington, DE 19810, USA) los ácidos nucleicos. Se ajustaron las concentraciones a la cantidad requerida para llevar a cabo las reacciones de secuenciación por medio de una PCR de secuenciación siguiendo las instrucciones del proveedor (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit). Una vez hecha la PCR de secuenciación se procedió a realizar su purificación y liofilización para su envío a secuenciación del fragmento de 1023pb. (Anexo 3)

Análisis de secuencias e identificación de mutaciones asociadas a farmacorresistencia.

La secuenciación del fragmento del gen *pol* del VIH-1 fue realizada en un secuenciador capilar ABI 3100 en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM usando los primers internos PR/RT.2F y 215/219.3R, ya reportados por McNulty y cols⁶⁹ Se usó el programa CLC Main Workbench versión 6 para hacer el análisis y edición de las secuencias para obtener las secuencias consenso del fragmento amplificado.

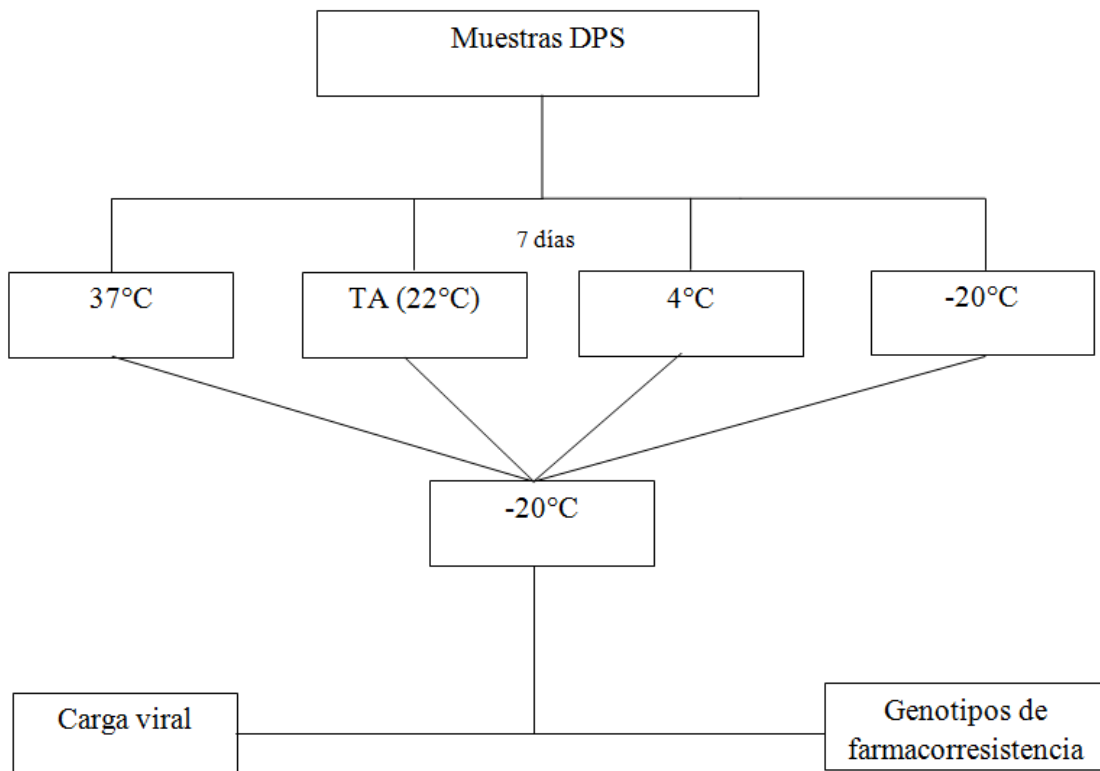
Para determinar los genotipos de farmacorresistencia para los inhibidores de la proteasa (IP) y para los inhibidores de la transcriptasa reversa (ITR) se usó el programa computarizado de Stanford (*Stanford Genotypic resistance interpretation algorithm*) de acceso libre en internet (<http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>.) El programa compara las secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenidos con las secuencias de su base de datos de referencia para determinar las mutaciones presentes en la muestra, detectando mutaciones en regiones de la TR y la PR del gen *pol* asociadas a farmacorresistencia y generando un reporte de farmacorresistencia a los ARVs. Finalmente, se compararon los resultados obtenidos en la secuenciación entre muestras pareadas (DPS y plasma líquido) de un mismo paciente para determinar la concordancia entre las muestras. Se mantuvo enmascaramiento del personal acerca de la información clínica del paciente. Con el siguiente diagrama de trabajo se hace un resumen de lo presentado en párrafos previos sobre la metodología empleada:

Esquema de trabajo en el laboratorio



Evaluación de la temperatura y tiempo de almacenamiento de las muestras DPS

Para evaluar la estabilidad de los ácidos nucleicos en muestras DPS, se elaboraron 4 papeles filtro por paciente de 4 pacientes distintos (total 16 papeles filtros) los cuales fueron almacenados a diferentes temperaturas (a 37°C, a temperatura ambiente (22°C), a 4°C y a -20°C) en bolsas de plástico individuales y con desecante. Todas estas muestras fueron almacenadas por 7 días a estas temperaturas para posteriormente almacenarlas todas a -20°C. El objetivo de almacenarlas sólo por 7 días en las distintas temperaturas y luego a -20°C se debe a que 7 días es el tiempo máximo esperado en que una muestra de una zona alejada del país pueda llegar a laboratorios centrales de referencia donde se cuenta con equipos de refrigeración a -20°C para que a su llegada se puedan almacenar a esta temperatura, que ha sido la temperatura más adecuada y aceptada internacionalmente para almacenar estas muestras en el laboratorio. A continuación se muestra un esquema de la evaluación de la temperatura y tiempo de almacenamiento en muestras DPS:



Clasificación de las variables

Variables predictoras

- Muestras DPS
- Muestras en plasma líquido
- Temperatura
- Tiempo de almacenamiento

Variables de resultado

Mutación (Genotipo de farmacorresistencia)

Carga viral

Definición operativa de las variables

Muestras DPS

Definición operacional: 50uL de plasma aplicado en cada círculo (disco) de papel filtro (Schleicher and Schuell 903, Keene. NH, USA) que se deja secar por 2 horas a temperatura ambiente previo a su almacenamiento.

Escala de medición: Nominal

Muestras en plasma líquido

Definición operacional: plasma líquido obtenido después de centrifugar sangre entera, el cual se mantiene en tubo cerrado refrigerado a -70°C previo a su análisis.

Escala de medición: Nominal

Temperatura

Definición operacional: Magnitud física que expresa el grado o nivel de calor medido en grados centígrados (°C) del ambiente donde se encuentra almacenada la muestra de DPS.

Escala de medición: Cuantitativa continua

Tiempo de almacenamiento

Definición operacional: Tiempo en días en que una muestra DPS es almacenada a partir del momento en que se aplica el plasma a cada círculo del papel filtro.

Escala de medición: Cuantitativa continua

Mutación (Genotipo de farmacorresistencia)

Definición operacional: Alteración o cambio en la secuencia del gen *pol* del VIH-1 caracterizada por la sustitución de un nucleótido que altera el código en un triplete de bases y puede o no causar la sustitución de un aminoácido por otro y que se asocia a resistencia a medicamentos ARVs.

Escala de medición: Nominal dicotómica

Carga viral

Definición operacional: Medición cuantitativa por PCR del RNA del VIH que se mide en copias/mL en muestras de plasma.

Escala de medición: Cuantitativa continua.

Análisis estadístico

Para las variables cuantitativas, se usó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar la asociación entre la CV de plasma líquido y la CV en DPS y se utilizó la prueba t de student para comparar la CV entre los grupos. Para las variables cualitativas se usó la prueba de chi-cuadrado. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Cálculo del tamaño de muestra

Se hicieron dos cálculos del tamaño de muestra para los dos componentes de la hipótesis (CV en DPS vs CV en plasma líquido y mutaciones de farmacorresistencia detectadas en DPS vs plasma líquido). Para la primera, los antecedentes en la literatura sobre la correlación de la CV en DPS vs plasma líquido reportan un coeficiente de correlación de 0.86 a 0.97⁵². Para la segunda, no hay antecedentes en la literatura que correlacionen las mutaciones en DPS vs plasma líquido por lo que se usará los datos obtenidos de estudios en DBS, donde se reporta una concordancia en la detección de mutaciones de farmacorresistencia de 0.82 a 1.0⁵³ en muestras DBS vs plasma líquido. Con base a estos dos antecedentes usaremos una magnitud del efecto (r) de 0.7 para ambas muestras como el valorar más pequeño del coeficiente de correlación que deberíamos encontrar, con un valor de α (bilateral) = 0.05 y β = 0.20, obteniendo un valor de 13 muestras de pacientes con VIH-1 para la comparación de la CV y 13 muestras para la determinación de los genotipos de farmacorresistencia. En el presente estudio decidimos incluir un total de 34 muestras.

Consideraciones éticas

Este protocolo se realizó de acuerdo a las normas de ética sobre investigación en sujetos humanos basadas en la Declaración de Helsinki y fue sometido a los Comités de Investigación y Ética de las Instituciones participantes siendo aprobado y registrado por este comité con el número 2010-064. Se solicitó el consentimiento informado de los pacientes que participaron en el estudio.

Consideraciones de Bioseguridad

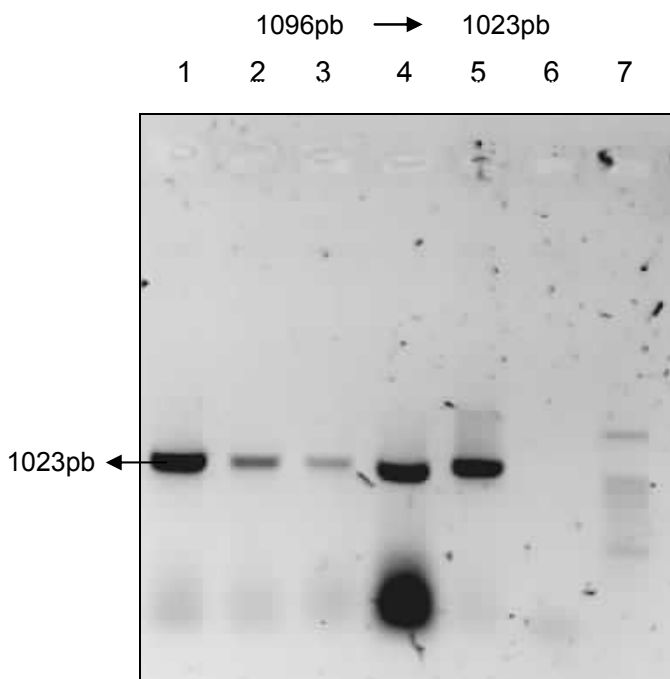
Para el presente trabajo de investigación se siguieron las normas de bioseguridad del laboratorio para el manejo y desecho de las muestras; y se siguieron las normas del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de investigaciones para la Salud, en su título cuarto, capítulo 1 "Bioseguridad de las investigaciones" (Art. 75-84).

RESULTADOS

Amplificación por RT-PCR anidado.

La extracción del RNA del VIH-1 a partir de estas muestras en DPS demostró que los ácidos nucleicos almacenados en esta forma son útiles para realizar amplificaciones por RT-PCR de fragmentos del genoma viral. En la figura 1 se observa un ejemplo de amplificación en una muestra en DPS a diferentes diluciones (muestra 20489).

Figura 1. Amplificación del fragmento de 1023pb en muestra DPS



Gel de agarosa al 1% con amortiguador TBE 1X, teñido con bromuro de etidio(1ug/1ul). PCR anidado del fragmento de 1023pb a partir de 1096pb. Carril 1: PCR anidado con 4ul dil 1:10 de 1096pb, HIV 20489-DPS. Carril 2: PCR anidado con 1ul dil 1:10 de 1096pb, HIV 20489-DPS. Carril 3: PCR anidado con 1ul dil 1:100 de 1096pb, HIV 20489-DPS. Carril 4: PCR anidado con 1ul dil 1:10 de 1096pb (primers a 50pmol). Carril 5: Control +. Carril 6: Control -. Se cargaron 5ul del PCR anidado en cada carril y 2ul de buffer de carga. Se cargó 5ul del marcador de 100pb (Carril 7). Cámara Gibco, gel apolo (peine de 15 pozos). Electroforesis a 70V/30min.

Evaluación de la Amplificación del fragmento de 1023pb de la región *pol*, en muestras almacenadas por tiempo prolongado.

En la primera etapa se analizaron 13 muestras en DPS (Tabla 1), cuyo promedio de CV en plasma líquido fue de 294.946 copias/mL (rango 19.300 a 1.275.000 copias/mL) y el tiempo promedio de almacenamiento de estas muestras fue de 2 años (16 a 910 días). Estas muestras en DPS estuvieron almacenadas a -20°C en el Laboratorio de Virología de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del CMN siglo XXI previo a su análisis. En lo referente al éxito de la amplificación de estas muestras, 4/13 (30.7%) amplificaron el fragmento de 1023pb, estas muestras fueron: 17287, 26, 18018 y 18021, cuyas CV fueron 1.275.000, 320.000,

508.000 y 152.000 copias/mL respectivamente. Tres de estas muestras (17287, 26 y 10821) fueron secuenciadas.

Tabla 1. Amplificación del fragmento de 1023pb del gen *pol* del VIH-1 en muestras DPS

Id. Muestras	Carga viral en plasma líquido (copias/mL)	Log₁₀	Duración de almacenamiento de muestras DPS (días)	Amplificación del fragmento de 1023pb
31	19.300	4.3	44	-
36	21.200	4.3	820	-
22	27.900	4.4	910	-
35	32.900	4.5	850	-
41	58.400	4.8	910	-
21	70.600	4.8	850	-
23	111.000	5.0	850	-
27	112.000	5.0	850	-
18021	152.000	5.2	880	+
26	320.000	5.5	850	+
18018	508.000	5.7	880	+
47	1.126.000	6.1	16	-
17287	1.275.000	6.1	850	+
Promedio	294.946	5.5	735 (2 años)	30.7%*

*Porcentaje de amplificación de las muestras (4/13).

Amplificación y secuenciación del fragmento 1023pb en muestras pareadas de DPS y plasma líquido.

En una segunda etapa (Tabla 2) se analizaron 17 muestras pareadas en DPS y plasma líquido (total 34 muestras), las cuales después de ser elaboradas se almacenaron a -20°C. El tiempo promedio en que las muestras estuvieron almacenadas fue de 7.4 días. La CV promedio en plasma líquido de estas muestras fue de 5.3log₁₀, mientras que la CV de estas muestras en DPS fue de 5.0log₁₀, obteniéndose una diferencia entre la CV en plasma líquido vs DPS de 0.3log₁₀, la cual no fue estadísticamente significativa ($p=0.51$) y cuyo coeficiente de correlación de Pearson fue de $r=0.95$ (Figura 2). En lo referente a la amplificación del fragmento de 1023pb, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \Rightarrow 0.05$) entre la amplificación de las muestras en DPS vs las muestras en

plasma líquido, lográndose amplificar muestras pareadas en el 58.8% (10/17). Todas las muestras que amplificaron en DPS lo hicieron en plasma líquido a excepción de la muestra 20488 que no amplificó en plasma líquido; de la misma manera la muestra 20455 amplificó en plasma líquido y no en su homóloga en DPS, obteniéndose al final un total de 21 secuencias de la región del gen *pol* que se utilizaron para analizar el genotipo de farmacorresistencia.

Tabla 2. Resultados de CV, amplificación del fragmento de 1023pb y secuenciación en muestras pareadas (DPS y plasma líquido) de pacientes con VIH-1.

Id. Muestras	Tiempo de almacenamiento (días)	CV** plasma líquido (log ₁₀ copias/mL)	CV DPS (log ₁₀ copias/mL)	Amplificación en DPS	Amplificación en plasma líquido	Secuencia en DPS	Secuencia en plasma líquido
20447	3	6,2	6,1	+	+	+	+
20443	7	5,4	4,8	+	+	+	+
20408	7	5,3	4,7	+	+	+	+
20486	7	5,2	4,5	+	+	+	+
20431	7	5,1	4,9	+	+	+	+
20455	7	5,0	4,7	-	+	-	+
20364	7	5,0	4,4	+	+	+	+
20488	12	5,0	4,4	+	-	+	-
20520	7	5,0	4,5	+	+	+	+
20413	12	4,9	4,9	+	+	+	+
20418	7	4,8	4,0	+	+	+	+
20454	7	4,7	3,8	-	-	-	-
20489	7	4,5	3,6	+	+	-	+
20466	7	4,3	3,5	-	-	-	-
20469	7	4,3	3,7	-	-	-	-
20362	7	4,3	3,5	-	-	-	-
20539	7	4,2	3,5	-	-	-	-
Promedio	7,4	5,3	5,0	(11/17)64,7%*	(11/17)64,7%*	(10/17)58,8%*	(11/17)64,7%*

* Porcentaje de muestras amplificadas y secuenciadas

**CV en DPS y plasma líquido medida con Amplicor HIV-1 Monitor™ Test, version 1.5.

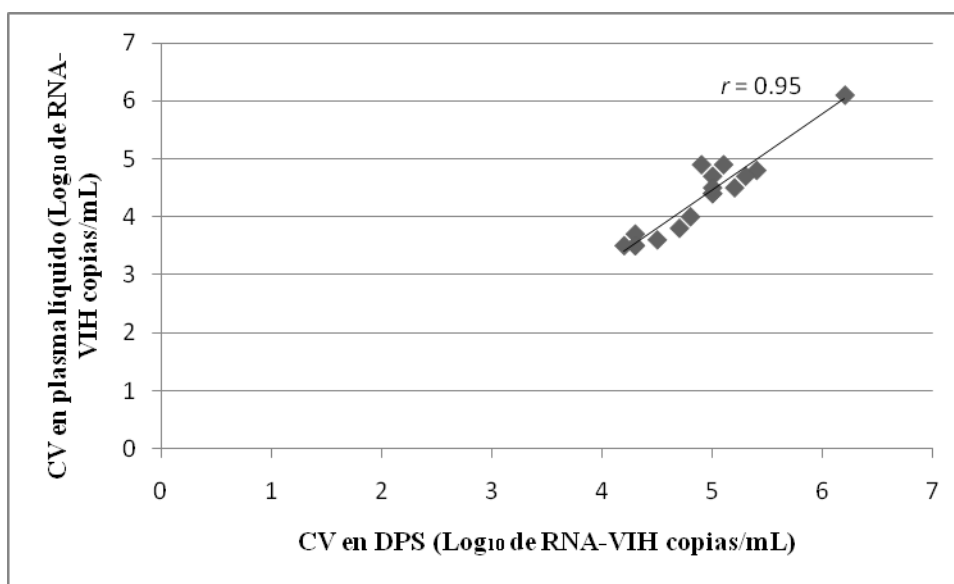


Figura 2. Correlación de la CV en plasma líquido y DPS (n=17 pacientes).

Almacenamiento de muestras DPS a diferentes temperaturas.

En lo referente a las diferentes temperaturas de almacenamiento, de las 4 muestras estudiadas, la CV de estas muestras fueron ampliamente diferentes con rangos de 111 ($2.0 \log_{10}$) a 1.210.000 copias/mL ($6.1 \log_{10}$) (Tabla 3). En todas las muestras almacenadas a diferentes temperaturas, se pudo cuantificar la CV, cabe hacer notar que en la muestra 1 se obtuvo una CV indetectable en todas las temperaturas, que concuerda con la CV baja que se obtuvo en plasma líquido (111 copias/mL). En la muestra 2 con CV en plasma líquido de 3.410 ($3.5 \log_{10}$) copias/mL, las CV en DPS fueron: 600 ($2.8 \log_{10}$) a -20°C , 1.380 ($3.1 \log_{10}$) a 4°C , 930 ($3.0 \log_{10}$) a temperatura ambiente y 1.085 ($3.0 \log_{10}$) copias/mL a 37°C . La muestra 3 tuvo una CV en plasma líquido de 1.210.000 copias/mL ($6.1 \log_{10}$), y las CV en DPS fueron en las distintas temperaturas de almacenamiento de: 24.400 ($4.4 \log_{10}$) a -20°C , 10.750 ($4.0 \log_{10}$) a 4°C , 35.850 ($4.6 \log_{10}$) a temperatura ambiente y 29.350 ($4.5 \log_{10}$) copias/mL a 37°C . Finalmente la muestra 4 tuvo una CV en plasma líquido de 96.300 ($5.0 \log_{10}$) copias/mL, mientras que sus muestras homólogas en DPS fueron de: 9.050 ($4.0 \log_{10}$) a -20°C , 3.160 ($3.5 \log_{10}$) a -4°C 2.475 ($3.4 \log_{10}$) a temperatura ambiente y 7.700 ($3.9 \log_{10}$) copias/mL a 37°C .

Tabla 3. CV en 4 muestras DPS almacenadas a diferentes temperaturas

Muestra No.	CV** en plasma líquido (log ₁₀)	CV en DPS (log ₁₀)				Tiempo de almacenamiento a diferentes temperaturas (días)	Tiempo de almacenamiento a -20°C (días)	Tiempo total de almacenamiento previo al análisis (días)
		-20°C	4°C	TA*	37°C			
1	2,0	ND	ND	ND	ND	7	28	35
2	3,5	2,8	3,1	3,0	3,0	7	20	27
3	6,1	4,4	4,0	4,6	4,5	7	7	14
4	5,0	4,0	3,5	3,4	3,9	7	0	7

*TA=Temperatura ambiente (22°C)

**CV medida en RNA copias/mL

ND= No detectable.

Sobre la eficacia de amplificación de las muestras almacenadas a diferentes temperaturas, sólo se pudo amplificar el fragmento de 1023pb en las muestras 3 y 4 (Tabla 4). En la muestra 3 se logró amplificar con las muestras almacenadas a -20°C y a temperatura ambiente, mientras que en la muestra 4 se logró amplificar en las muestras almacenadas a 4°C y a 37°C. En las muestras 1 y 2 no se logró amplificar a ninguna temperatura. Estas dos muestras amplificadas (3 y 4) en DPS se amplificaron también de forma pareada en plasma líquido y se enviaron a secuenciar, haciendo un total de 4 secuencias obtenidas.

Tabla 4. Éxito de amplificación del fragmento de 1023pb en muestras DPS almacenadas a diferentes temperaturas

Muestra No.	CV* en plasma líquido (log ₁₀)	Temperaturas de almacenamiento en DPS			
		-20°C	4°C	TA	37°C
1	2,0	-	-	-	-
2	3,5	-	-	-	-
3	6,1	+	-	+	-
4	5,0	-	+	-	+

*CV medida en RNA copias/mL

- : muestras que no amplificaron

+ : muestras que si amplificaron

Genotipos de farmacorresistencia

De las tres etapas del estudio se obtuvieron un total de 28 muestras en DPS y plasma líquido para secuenciar el fragmento de 1023pb, de estas se logró secuenciar 20 muestras en las que se analizaron las mutaciones de farmacorresistencia. En las 8 muestras restantes no fue posible obtener el genotipo de farmacorresistencia debido a que sólo se alcanzó a leer un número bajo de nucleótidos (rango: 180-280) no aptos para el análisis de mutaciones de farmacorresistencia con la metodología de Stanford, cuyo valor mínimo de nucleótidos para el análisis de mutaciones es de 150 para la PR y 300 para la TR. Todas las muestras secuenciadas fueron del subtipo B del VIH-1 y en 8 de ellas (40%=8/20) se encontraron mutaciones de farmacorresistencia para los inhibidores de la transcriptasa reversa y para los inhibidores de la proteasa. Estas mutaciones de farmacorresistencia se encontraron principalmente en la región de la TR. (Tabla 5).

Tabla 5. Mutaciones de farmacorresistencia en regiones de la proteasa (PR) y la transcriptasa reversa (TR) del VIH-1.				
Muestra No.	Subtipo del VIH-1	Codones		Mutaciones de farmacorresistencia
		PR	TR	
26-DPS	B	-	98-242	No
18021-DPS	B	-	65-240	TR (INTR): K65R, D67K, T69Y, L74V, M184V, L210W, T215D (INNTR): K101H, V108I, Y181C, G190A
20364-P	B	-	136-248	TR (INNTR): V179D
20413-P	B	22-99	1-235	PR (IP): M46L**, I54V**, V82A**, L24I, *L33F*, K43T*, A71T*, G73C* TR (INTR): D67N, L74V, M184V, L210W, T215Y, K219Q. (INNTR): Y188L
20408-DPS	B	-	2-251	TR (INNTR): V108I
20418-DPS	B	-	2-251	TR (INTR): D67N, T69N, K70R, L210W, T215F, K219E
20418-P	B		126-250	TR (INTR): L210W, T215F, K219E
20431-DPS	B	-	2-213	No
20431-P	B		88-236	No
20443-DPS	B	40-99	1-215	TR (INNTR): V179D
20447-P	B	15-99	1-248	No
20447-DPS	B	22-99	1-248	No
20486-DPS	B	-	1-248	No
20489-P	B	-	113-248	No
20520-P	B	-	96-248	No
20520-DPS	B		1-248	No
3-DPS	B	22-99	1-247	TR (INTR): K219Q
3-P	B	-	1-251	TR (INTR): K219Q
4-DPS	B	26-99	1-237	PR (IP) : A71V*
4-P	B	22-99	1-249	No

INNTR: Inhibidores No Nucleósidos de la TR

INTR: Inhibidores Nucleósidos de la TR

IP: Inhibidores de la proteasa

** Mutaciones de resistencia mayores a los IP

* Mutaciones de resistencia menores a los IP

P=Muestra en plasma líquido. DPS=Muestra en DPS (*dried plasma spot*).

En seis muestras se obtuvieron las secuencias pareadas en DPS y plasma líquido, donde se identificaron las mismas mutaciones de farmacorresistencia en ambos tipos de muestras. De estas muestras pareadas se identificaron 4 mutaciones de farmacorresistencia en las muestras de plasma líquido, mientras que en las muestras DPS se identificaron 8 mutaciones. Las mutaciones D67N, T69N y K70R, presentes en las muestras DPS y no así en la de plasma líquido se debió a que en esta última no se alcanzaron a leer los nucleótidos que abarcan esta región (codones 2-126) y la secuencia no incluyó esos aminoácidos de la TR. Sólo en la muestra 4-DPS se obtuvo una mutación menor para los inhibidores de la proteasa (IP) que no se observó en su homóloga en plasma líquido. Sin embargo esta mutación (A71V) no afectó la susceptibilidad a los IP y el patrón de farmacorresistencia en ambas muestras fue el mismo. El número de nucleótidos secuenciados fue mayor en las muestras DPS (875) en comparación con las muestras homólogas en plasma líquido (688) de un total de 1023 nucleótidos esperados (Tabla 6).

Tabla 6. Número de nucleótidos secuenciados* del fragmento de 1023pb del gen *pol* del VIH-1 y mutaciones de farmacorresistencia en muestras de plasma líquido y sus homólogas en DPS.

Muestra No.	Plasma líquido		DPS	
	Nucleótidos (%)	Mutaciones	Nucleótidos (%)	Mutaciones
20418	376 (37)	TR (INTR): L210W, T215F, K219E	753 (74)	TR (INTR): D67N, T69N, K70R, L210W, T215F, K219E
20431	447 (44)	No	744 (73)	No
20447	1001 (98)	No	982 (96)	No
20520	461 (45)	No	853 (83)	No
3	858 (84)	TR (INTR): K219Q	980 (96)	TR (INTR): K219Q
4	983 (96)	No	937 (92)	PR (IP) : A71V
Promedio	688 (67)		875 (86)	

*Secuencias obtenidas usando el secuenciador capilar ABI 3100.

TR: Transcriptasa reversa

INTR: Inhibidores Nucleósidos de la TR

PR: Proteasa

IP: Inhibidores de la proteasa

Todas las mutaciones de farmacorresistencia identificadas afectaron el patrón de susceptibilidad a los ARVs con la excepción de la mutación menor A71V que no modificó la susceptibilidad a los IP. (Tabla 7)

Tabla 7. Interpretación de las mutaciones de farmacorresistencia para los inhibidores de la TR y para los inhibidores de la PR

Muestra No.	Mutación(es)*	Interpretación de farmacorresistencia*
20364-P	INNTR:V179D	<p>Inhibidores No-Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INNTR)</p> <p>Delavirdine (DLV) Potencial nivel bajo de resistencia</p> <p>Efavirenz (EFV) Potencial nivel bajo de resistencia</p> <p>Etravirine (ETR) Potencial nivel bajo de resistencia</p> <p>Nevirapine (NVP) Potencial nivel bajo de resistencia</p>
20408-DPS	INNTR:V108I	<p>Inhibidores No-Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INNTR)</p> <p>Delavirdine(DLV) Potencial nivel bajo de resistencia</p> <p>Efavirenz (EFV) Potencial nivel bajo de resistencia</p> <p>Etravirine (ETR) Susceptible</p> <p>Nevirapine (NVP) Potencial nivel bajo de resistencia</p>
20413-P	<p>IP (mayores):</p> <p>M46L, I54V, V82A</p> <p>IP (menores):</p> <p>L24I, L33F, K43T, A71T, G73C</p>	<p>Inhibidores de la Proteasa (IP)</p> <p>Atazanavir/r (ATV/r) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Darunavir/r (DRV/r) Susceptible</p> <p>Fosamprenavir/r (FPV/r) Resistencia intermedia</p> <p>Indinavir/r (IDV/r) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Lopinavir/r (LPV/r) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Nelfinavir (NFV) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Saquinavir/r (SQV/r) Resistencia intermedia</p> <p>Tipranavir/r (TPV/r) Bajo nivel de resistencia</p>
20413-P	<p>INTR: D67N, L74V, M184V, L210W, T215Y, K219Q</p> <p>INNTR: Y188L</p>	<p>Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INTR)</p> <p>Lamivudine (3TC) Elevado nivel de resistencia</p>

		<p>Abacavir (ABC) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Zidovudine (AZT) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Stavudine (D4T) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Didanosine (DDI) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Emtricitabine (FTC) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Tenofovir (TDF) Resistencia intermedia</p> <p>Inhibidores No-Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INNTR)</p> <p>Delavirdine (DLV) Resistencia Intermedia</p> <p>Efavirenz (EFV) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Etravirine (ETR) Potencial nivel bajo de resistencia</p> <p>Nevirapine (NVP) Elevado nivel de resistencia</p>
20418-DPS	INTR: D67N, T69N, K70R, L210W, T215F, K219E	<p>Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INTR)</p> <p>Lamivudine (3TC) Potencial nivel bajo de resistencia</p> <p>Abacavir (ABC) Resistencia Intermedia</p> <p>Zidovudine (AZT) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Stavudine (D4T) Elevado nivel de resistencia</p> <p>Didanosine (DDI) Resistencia Intermedia</p> <p>Emtricitabine (FTC) Potencial nivel bajo de resistencia</p> <p>Tenofovir (TDF) Resistencia Intermedia</p>
20418-P	INTR: L210W, T215F, K219E	<p>Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INTR)</p> <p>Lamivudine (3TC) Susceptible</p> <p>Abacavir (ABC) Resistencia Intermedia</p> <p>Zidovudine (AZT) Elevado nivel de resistencia</p>

		Stavudine (D4T) Resistencia Intermedia Didanosine (DDI) Resistencia Intermedia Emtricitabine (FTC) Susceptible Tenofovir (TDF) Bajo nivel de resistencia
20443-DPS	INNTR: V179D	Inhibidores No-Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INNTR) Delavirdine (DLV) Potencial nivel bajo de resistencia Efavirenz (EFV) Potencial nivel bajo de resistencia Etravirine (ETR) Potencial nivel bajo de resistencia Nevirapine (NVP) Potencial nivel bajo de resistencia
3-DPS y P	INTR: K219Q	Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INTR) Lamivudine (3TC) Susceptible Abacavir (ABC) Susceptible Zidovudine (AZT) Bajo nivel de resistencia Stavudine (D4T) Potencial nivel bajo de resistencia Didanosine (DDI) Susceptible Emtricitabine (FTC) Susceptible Tenofovir (TDF) Susceptible
18021-DPS	INTR: K65R, D67K, T69Y, L74V, M184V, L210W, T215D INNTR: K101H, V108I, Y181C, G190A	Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INTR) Lamivudine (3TC) Elevado nivel de resistencia Abacavir (ABC) Elevado nivel de resistencia Zidovudine (AZT) Bajo nivel resistencia Stavudine (D4T) Resistencia intermedia Didanosine (DDI) Elevado nivel de resistencia Emtricitabine (FTC) Elevado nivel de resistencia

		Tenofovir (TDF) Resistencia intermedia Inhibidores No-Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INNTR) Delavirdine (DLV) Elevado nivel de resistencia Efavirenz (EFV) Elevado nivel de resistencia Etravirine (ETR) Elevado nivel de resistencia Nevirapine (NVP) Elevado nivel de resistencia
4-DPS	IP (menores): A71V	Inhibidores de la Proteasa (IP) Atazanavir/r (ATV/r) Susceptible Darunavir/r (DRV/r) Susceptible Fosamprenavir/r (FPV/r) Susceptible Indinavir/r (IDV/r) Susceptible Lopinavir/r (LPV/r) Susceptible Nelfinavir (NFV) Susceptible Saquinavir/r (SQV/r) Susceptible Tipranavir/r (TPV/r) Susceptible

*Mutaciones de farmacoresistencia y perfiles de susceptibilidad a los ARVs obtenidos con el programa computarizado de Stanford (*Stanford Genotypic resistance interpretation algorithm*) de acceso libre en internet (<http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>.)

Discusión

La efectividad del tratamiento ARV, se evalúa habitualmente por medio de la cuantificación de las células T CD4+ así como de la medición de la CV, y en caso de sospechar de falla terapéutica, de la determinación de mutaciones de farmacoresistencia.⁵² En los países desarrollados, los pacientes que reciben tratamiento ARV son monitorizados regularmente por medio de estas pruebas según sus guías de manejo de pacientes con VIH.^{53,54,55} En los últimos años se han realizado esfuerzos para ampliar la cobertura de esta monitorización del tratamiento ARV en países de medianos y bajos ingresos dado que en estos se presentan más del 90% de las nuevas infecciones por el VIH-1.⁵⁶ Algunos obstáculos para que esta monitorización no se haya realizado en estos países, sobre todo en lo que a la medición de CV y determinación de genotipos de farmacoresistencia se refiere, son debido al elevado costo de estas pruebas, la necesidad de una apropiada toma de muestra de plasma, así como el transporte, almacenamiento y el procesamiento de la misma en laboratorios de biología molecular que cuenten con la infraestructura y el personal adecuados para el análisis de estas muestras. Lamentablemente, muchos países en vías de desarrollo no realizan de manera rutinaria mediciones de CV ni determinaciones de mutaciones de farmacoresistencia y utilizan los criterios de la OMS (criterios clínicos e inmunológicos) para detectar falla

terapéutica, sin embargo algunos estudios demuestran que estos criterios tienen pobre sensibilidad y especificidad para detectar una verdadera falla virológica,^{57,58} lo que conlleva el riesgo de que los pacientes con VIH bajo tratamiento ARV acumulen gran número de mutaciones con un elevado nivel de resistencia a los ARVs que hagan que las opciones terapéuticas sean mínimas o inexistentes.

Ante este panorama, una alternativa para la monitorización de la CV y los genotipos de farmacorresistencia en lugares con limitada capacidad laboratorial es el uso de las muestras en papel filtro. Las muestras en DBS han sido las más ampliamente usadas para este fin y se ha demostrado su utilidad para la medición de la CV,^{39,44,48,59,60,61,62,63,64,65} así como para la determinación de genotipos de farmacorresistencia^{45,46,49,50,66,67,68,69,70,71} en pacientes con VIH-1. La principal ventaja de los DBS es que no se requiere centrifugar la muestra y puede ser realizado por personal no especializado; sin embargo algunas desventajas es la sobreestimación de los niveles de CV gracias a la contribución del DNA proviral de las células mononucleares de la sangre periférica^{72,63} ya que éste DNA proviral participa en un 33-80% en el éxito de la amplificación de las muestras DBS,^{67,34} otra desventaja es la necesidad de un método apropiado de extracción para remover los inhibidores de la PCR que se encuentran presentes en los eritrocitos.⁷³ A diferencia de las muestras en DBS, las muestras en DPS tienen la ventaja de dar mediciones de CV equiparables a la del plasma líquido (estándar de oro) debido a que se elimina la contribución del DNA proviral. Por otro lado los métodos estándares de genotipificación utilizan plasma para este fin, y más importante aún, se ha reportado que las mutaciones de resistencia aparecen más temprano en plasma que en el DNA proviral,⁷⁴ lo que resultaría en una mayor sensibilidad para detectar falla temprana al tratamiento en plasma que en DBS.⁵² En nuestro estudio decidimos usar muestras DPS por lo antes mencionado y porque en nuestro laboratorio recibimos muestras de plasma procedentes de otros estados de la republicana mexicana para la realización de CV, pudiendo aprovechar usar el mismo tipo de muestra (plasma) para realizar los genotipos de farmacorresistencia.

En todas las muestras estudiadas se pudo cuantificar la CV en DPS, como lo reportó previamente Alvarez-Muñoz y cols⁴⁸. Un punto importante sobre el uso de las muestras en papel filtro para medir la CV, es alcanzar el nivel más bajo de detección de CV en estas muestras, siendo un nivel aceptable en países subdesarrollados para la OMS de $3.7 \log_{10}$, dado que la posibilidad de progresión de la enfermedad es baja con CV por debajo de este valor.⁷⁵ En nuestro estudio se pudo medir la CV de muestras con CV de hasta $3.5 \log_{10}$. Así mismo, hubo una aceptable correlación entre la CV de las muestras en plasma líquido ($5.3 \log_{10}$) vs las muestras en DPS ($5.0 \log_{10}$), cuya diferencia promedio fue de $0.3 \log_{10}$, similar a otros estudios donde esta diferencia fue de $0.077 \log_{10}$ copias/mL⁵⁹ a $0.64 \log_{10}$ copias/mL.⁶⁴ Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las muestras DPS pueden ser utilizadas en el seguimiento de pacientes con VIH-1.

La estabilidad de los ácidos nucleicos se ha visto comprometida con el tiempo y temperatura de almacenamiento de las muestras en papel filtro. Diferentes estudios han

demostrado un efecto negativo sobre la amplificación en muestras almacenadas por periodos prolongados de tiempo.^{46,64,68} Sin embargo, otros estudios muestran que periodos prolongados de almacenamiento como 1 año⁴⁵ o hasta 5-6 años no afectan de manera considerable el éxito de la amplificación.⁶⁹ En nuestro estudio, sólo el 30% de las muestras almacenadas por un tiempo promedio de 2 años amplificaron el fragmento de 1023pb, esto puede deberse a condiciones inadecuadas de almacenamiento, como ultracongeladores con escarcha, al tiempo prolongado del mismo, así como a la mayor facilidad de degradación del RNA en las muestras DPS así como al tamaño del fragmento, ya que se ha demostrado que los fragmentos largos son más sensibles a la degradación de los ácidos nucleicos en comparación con los fragmentos más pequeños que tienen mayor éxito de amplificación.^{45,69} Por otro lado, en el grupo de muestras almacenadas por un tiempo promedio de ~7 días, la eficacia de la amplificación se elevó a 64.7%, demostrando en nuestro estudio que el tiempo prolongado de almacenamiento afecta negativamente la amplificación en muestras DPS. Así mismo diferentes estudios han demostrado que el valor de CV es un factor fundamental sobre la eficacia de la amplificación de las muestras en papel filtro, haciéndose efectiva la amplificación en muestras DPS con CV por encima de 15.000 copias/mL⁷⁶ y por encima de 6.000,⁴¹ 14.000⁴⁹ y 10.000⁴⁵ copias/mL en muestras DBS usando métodos comerciales de genotipificación. En nuestro estudio, en las muestras almacenadas por tiempo prolongado se amplificó el fragmento de 1023pb en aquellas muestras con CV por encima de 150.000 copias/mL ($5.2\log_{10}$), mientras que en las muestras almacenadas por ~7 días se logró amplificar muestras con CV por arriba de 35.000 copias/mL ($4.5\log_{10}$). Es indiscutible que el éxito de amplificación es menor cuando se usa muestras DPS en comparación con las muestras DBS, en un estudio donde igualmente se amplificó el fragmento de 1023pb usando una RT-PCR casera⁶⁹ sólo se pudo amplificar esta región del gen *pol* en muestras DPS con CV de 338.112 copias/mL almacenadas a -30°C por 6 años y con CV de 57.375 copias/mL a -70°C por 5 años, mientras que valores de CV mucho más bajos se pudieron amplificar en las muestras DBS. Si bien las muestras DPS presentan menor porcentaje de amplificación en comparación con las muestras DBS, esto debido principalmente al DNA proviral presente en estas últimas, las muestras DPS dan resultados más cercanos y equiparables al plasma líquido que se usa como muestra estándar para medir CV y genotipos de farmacoresistencia. Se ha visto que el éxito de amplificación es mayor cuando se usa un ensayo de RT-PCR casero en comparación con los métodos comerciales de ViroSeq (Abbott Molecular, IL, USA) y TruGene (Siemens Healthcare Diagnostics, IL, USA), ofreciendo una ventaja más para el uso y desarrollo de metodologías de RT-PCR caseras en países en vías de desarrollo, dado que el precio de las pruebas comerciales es de aproximadamente \$230 y su porcentaje de amplificación es menor.⁵³

Otro objetivo de nuestro estudio fue evaluar el efecto de las diferentes temperaturas de almacenamiento de las muestras DPS. Como se esperaba las muestras con baja CV, (muestras 1 y 2) no amplificaron a ninguna temperatura, por el contrario se pudo amplificar el fragmento de 1023pb en muestras almacenadas a temperatura ambiente (22°C), 4°C, 37°C y a -20°C. Llama la atención que la muestra 4 no haya amplificado a -

20°C y si en las otras temperaturas, dado que esta temperatura ha sido la más aceptada para el almacenamiento en los laboratorios de investigación,⁵³ sobre todo por periodos prolongados (>30 días) de tiempo.⁷⁷ Esto probablemente se deba a errores manuales durante la extracción del RNA o la amplificación, los cuales son mucho más frecuentes por la mayor manipulación que existe con los métodos no automatizados. El objetivo de evaluar las diferentes temperaturas almacenadas por un tiempo de 7 días es porque en las distintas ciudades que no cuentan con laboratorios de referencia e incluso con refrigeradores, se pueda mantener las muestras DPS a temperatura ambiente o en su caso en un refrigerador de 4°C y ser enviadas a nuestro laboratorio en un tiempo máximo de 7 días que sería un tiempo aceptable en que lleguen las muestras, las cuales pueden ser posteriormente almacenadas a -20°C hasta su análisis. Si bien el número de muestras que se estudiaron para evaluar las temperaturas fue pequeño se pudo amplificar el fragmento de 1023pb en las cuatro temperaturas, lo que indicaría que las muestras DPS pudieran ser enviadas a cualquiera de estas temperaturas en un lapso de una semana, sin que ello afectara la eficacia de la medición de la CV y de la amplificación, aunque estudios con un mayor número de muestras y usando estas cuatro temperaturas se deberían hacer en un futuro.

En lo referente a las mutaciones de farmacorresistencia, las muestras DPS fueron útiles para obtener una secuencia del virus del VIH-1, si bien no se pudo secuenciar todo el tamaño del fragmento esperado (1023pb) y se secuenció más la región de TR que el de la PR, se demostró que las DPS son una muestra aceptable para este fin y que al comparar las mutaciones identificadas en DPS con sus homólogas en plasma líquido se identificaron las mismas mutaciones en el mismo número de codones comparados. Sólo una muestra tuvo una mutación no encontrada en su homóloga, sin embargo esta fue una mutación menor a los IP y que no modificó el patrón de susceptibilidad a los IP; esta mutación (A71T/V) es un polimorfismo que ocurre en 2-3% de las personas sin tratamiento ARV, pero cuya frecuencia se incrementa en personas que reciben IP. Llama la atención en nuestro estudio que usando el *primer reverse* (215/219.3R) se obtuvo una mayor longitud de nucleótidos en comparación con el *primer forward* (PR/RT.2F) en todas las muestras, por lo que se debe valorar el uso de otros *primers forward* para mejorar la longitud de las secuencias en un futuro. No hay estudios de genotipificación en muestras DPS que comparan las mutaciones identificadas en muestras DPS vs plasma líquido, la gran mayoría de estos estudios se realizaron usando DBS, donde las mutaciones encontradas en plasma líquido fueron también detectadas en las muestras DBS en un 82-100%,⁵³ muy cercano al valor del 83% encontrado en nuestro estudio. Al igual que el estudio de McNulty y cols.⁶⁹ lo que resalta de nuestro estudio es que se pudo amplificar un fragmento largo del gen *pol* del VIH usando un volumen de sólo 100uL de plasma seco, el cual se pudo secuenciar para obtener las mutaciones de farmacorresistencia a los ARVs. En 40% de los pacientes estudiados se encontraron mutaciones de farmacorresistencia a los ARVs, muchos de estos pacientes tuvieron un elevado nivel de resistencia tanto a los INTR como a los IP. Previamente en ninguno de estos pacientes se contaba con pruebas de farmacorresistencia. Si bien en este estudio no se hizo seguimiento de los pacientes estudiados, preocupa el elevado hallazgo de mutaciones de

farmacorresistencia y su repercusión en la susceptibilidad a los ARVs, lo que debe reforzar la monitorización del tratamiento ARV en pacientes con VIH en nuestro país, dado que un paciente con infección por el VIH-1 puede transmitir un virus farmacorresistente a su entorno y al mismo tiempo presentar mala respuesta al tratamiento ARV con el subsecuente daño al sistema inmunológico y aparición consecuente de infecciones oportunistas; por lo que una temprana detección de falla terapéutica debida a mutaciones del virus permitiría un cambio oportuno a un segundo régimen de medicamentos ARVs previniendo la acumulación de mutaciones de farmacorresistencia.

Algunas limitaciones de nuestro estudio son que no se identificaron los motivos por el cual algunas muestras con CV altas no amplificaron, lo que indicaría que factores manuales y no de la muestra afectaron el éxito de la amplificación. Si bien en todas las pruebas de RT-PCR se incluyeron controles positivos y negativos, muchas variables pudieron haber intervenido en el éxito de la amplificación. Por otro lado, la longitud de las secuencias que se obtuvieron en las muestras DPS fue del 86% del número de nucleótidos esperados sin poder hacer el análisis de todo el fragmento de 1023pb (100%) lo que ocasionó que en gran parte de las muestras no se obtuviera un número adecuado de codones de la PR para su análisis, esto probablemente se deba al mal o pobre alineamiento de los *primers* en esta región de la PR y a la metodología usada en la secuenciación. No se hizo seguimiento de los pacientes y no se correlacionaron los hallazgos moleculares con los datos clínicos de falla terapéutica en los pacientes donde se identificaron las mutaciones de farmacorresistencia.

En un futuro se debe comparar las diferentes metodologías empleadas en cada uno de los pasos del análisis de las muestras (extracción del RNA, síntesis de cDNA, amplificación, *primers*, PCR, secuenciación, etc) con el fin de identificar el mejor método que proporcione los mejores resultados en nuestras manos y poder así elevar la eficacia de la amplificación y mejorar la sensibilidad de la CV en aquellas muestras con CV baja (<15.000 copias/mL), ya que como lo demostró Monleau y cols.⁷² la extracción del RNA es un punto crítico para la eficacia de la amplificación, la cual depende del método de extracción que se use. Los métodos automatizados y los métodos de biología molecular como “one step” o RT-PCR en tiempo real son una mejor alternativa para trabajar virus de RNA porque se reduce el tiempo del procedimiento como los errores manuales y el riesgo de contaminación cruzada por la manipulación de las muestras, sin embargo los costos son mayores y poco accesibles para la gran mayoría de laboratorios de nuestro país. Mientras se resuelvan estos problemas de infraestructura en nuestros laboratorios, el uso de métodos caseros son la única alternativa en nuestro medio para mejorar el acceso a estas pruebas de farmacorresistencia para los pacientes que viven con el VIH, ya que a pesar que la gran mayoría de ellos cuentan con acceso al tratamiento ARV muchos de ellos pueden perder la batalla por la emergencia de virus farmacorresistentes que no se detectan a tiempo.

CONCLUSIONES

En conclusión, los datos obtenidos en nuestro estudio muestran la factibilidad de utilizar en nuestro país a las muestras DPS como una alternativa para la monitorización del tratamiento ARV y la evolución de la enfermedad. Idealmente, las muestras de sangre deberían ser centrifugadas en los laboratorios periféricos donde se elaborarían los DPS y se mandarían en sobres vía postal en un lapso no mayor a los siete días desde su elaboración para que a su llegada a los laboratorios centrales sean almacenados a -20°C para su análisis respectivo. Así mismo, las muestras de plasma líquido que se envían habitualmente para la medición de CV pueden ser útiles para elaborar DPS, ahorrándose un doble envío de muestras para realizar genotipos de farmacorresistencia; por lo que se debe capacitar al personal de laboratorios de referencia para usar la metodología de las muestras en DPS. El establecer una eficiente vigilancia de farmacorresistencia en países con el mayor número de casos de infección por el VIH es una herramienta fundamental de salud pública que ayudaría a evaluar la prevalencia de farmacorresistencia del VIH en determinada región y permitiría ajustar las guías de tratamiento ARV si fuera necesario. Se debe continuar la investigación en esta área para poder estandarizar la metodología de las muestras DPS para su uso a gran escala en nuestro país y mejorar de esta manera la monitorización del tratamiento ARV de los pacientes que viven con el VIH/SIDA.

Difusión

- I. Se enviará una publicación a revistas científicas con arbitraje estricto.
- II. Tesis de maestría en ciencias médicas para obtener el grado.
- III. El trabajo fue presentado en Congresos nacionales e internacionales:
 - XXIX Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica. Puebla, México. 24-27 de noviembre de 2010, obteniendo el **3er lugar en el área de investigación básica.**
 - PIDS Pediatric Infectious Diseases Research Conference. St. Jude, Memphis, TN. USA, 11-12 de febrero de 2011.
 - Primer Congreso de Alumnos del Posgrado de la UNAM, Distrito Federal, México. 18-20 de mayo de 2011.
 - XIV Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica (SLIPE 2011). Punta Cana, República Dominicana. 25-28 de mayo de 2011, **obteniendo el 1er lugar en la categoría de VIH.**

CARTA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) y en el Centro Médico Siglo XXI (IMSS) se está llevando a cabo una investigación que tiene como título **"Utilidad de muestras de plasma seco fijado en papel filtro (DPS) para realizar genotipo de farmacorresistencia en pacientes con VIH-1/SIDA"**. Con este estudio evaluaremos una prueba de laboratorio que nos permita detectar cambios genéticos en el virus que predispone a resistencia a los medicamentos por el VIH. El VIH es un virus que se ha estado propagando rápidamente en los últimos años, al mismo tiempo que se han producido medicamentos que controlan en cierto sentido la enfermedad, prolongando la vida de las personas que cursan con la enfermedad, a la vez que evita indirectamente complicaciones infecciosas por la recuperación de las defensas gracias al tratamiento. Sin embargo en los últimos años han comenzado a aparecer virus que son resistentes a ciertos medicamentos antirretrovirales, lo que complica el manejo de estos pacientes. Es en este sentido que es necesario realizar pruebas de laboratorio que identifiquen a estos virus resistentes para poder dar el/los mejor(es) medicamento(s) que puedan combatir al virus. La prueba diagnóstica que evaluaremos es una prueba más fácil de realizar, más económica y más fácil de transportar por lo que puede ser muy útil en países en vías de desarrollo como el nuestro. Para formalizar nuestras acciones es necesario que usted o el padre, madre o tutor, en caso de los niños, dé su autorización para que se le tome una única muestra de sangre, esta técnica es comúnmente utilizada y consiste en un piquete por medio de una aguja conectada a una jeringa (ambas estériles) para extraer sangre, procedimiento que dura aproximadamente 1-2 minutos. La aceptación de participar voluntariamente en el protocolo, se establecerá al firmar esta carta. También puede rehusar a participar sin que esto repercuta en la atención del menor o la suya, no habrá represalias, ni perderá sus derechos. En caso de aceptar, todos los datos e información generados en este trabajo se mantendrán en estricta confidencialidad.

El investigador principal se compromete a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que se le plantee de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Nombre del paciente(a) _____
 Edad _____ Sexo (F) (M)

Nombre del familiar o tutor _____
 Dirección _____ Col _____ Municipio _____
 Estado _____
 Teléfono _____ Fecha _____

Firma _____

Testigo # 1

Nombre: _____ Firma _____
 Dirección _____ Col _____ Municipio _____
 Estado _____ Teléfono _____ Fecha _____
 Relación con el sujeto de estudio _____

Testigo # 2

Nombre: _____ Firma _____
 Dirección _____ Col _____ Municipio _____
 Estado _____ Teléfono _____ Fecha _____
 Relación con el sujeto de estudio _____

Investigador responsable: Dr. Juan Pablo Rodríguez Auad Firma _____

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Hospital de Pediatría 2º piso, CMN Siglo XXI. Av. Cuauhtemoc 330 Col. Doctores. Del. Cuauhtemoc, México DF. CP. 06720. Telf. 56276900 Ext. 22407. Fax: 56275940. e mail: juparodau@hotmail.com

**PROCEDIMIENTO PARA MEDICIÓN DE CARGA VIRAL
(HIV MONITOR v.1.5 PRE-PCR: PREPARACIÓN DE MUESTRAS-ULTRA SENSIBLE)**

1. Pre-enfríe la centrifuga de alta velocidad a 4°C.
2. En la hoja de registro anote las localizaciones de los controles y de las muestras en el A-ring, así como el número del lote y el número de copias de QS específico de este lote.
3. Codifique un tubo Sardstedt de 1.5mL por cada muestra que va a ser procesada, incluyendo tubos para los Controles Negativo, Positivo Bajo, Positivo Alto. Ponga una marca de orientación en cada tubo.
4. Añada **500µL** del Plasma Humano Normal (NHP), previamente mezclado, solamente en los tubos que serán utilizados para procesar los controles.
5. Añada **500µL** de muestra, previamente mezclada, a su respectivo tubo.
6. Coloque los tubos en la centrifuga de alta velocidad con la marca de orientación hacia afuera. Centrifugue los tubos durante **1 hora** a **23,000g** y a **4°C** de temperatura.
7. Retire el sobrenadante utilizando una pipeta de transferencia desechable con punta fina, retire tanto sobrenadante como sea posible, cuidando de no tocar el pellet.
8. Durante la hora de centrifugación, disuelva los cristales que se forman en el Buffer de Lisis (**HIV-1 Lys**) calentándolo a 25-37°C y mezclándolo vigorosamente. Asegúrese que al momento de usarlo esté a temperatura ambiente.
9. Prepare la solución de trabajo del Buffer de Lisis añadiendo 25µL del Estándar de Cuantificación (**HIV-1 QS**), previamente mezclado con el vórtex, a un vial de Buffer de Lisis (**HIV-1 Lys**). Mezcle bien agitando en el vórtex.
10. Prepare etanol al 70% añadiendo 7mL de etanol absoluto a 3mL de agua desionizada, o mezcle 11mL de etanol al 95% con 4mL de agua desionizada.
11. Añada **600µL** de la solución de trabajo del Buffer de Lisis a cada tubo con los pellets.
12. Mezcle los Controles Negativos, Positivo Bajo y Positivo Alto y añada **12,5µL** a su correspondiente tubo. Mezcle bien en el vórtex.
13. Incube todos los tubos a **temperatura ambiente** durante **10 minutos**.
14. Añada **600µL** de **isopropanol** a cada tubo. Mezcle bien en el vórtex.
15. Ponga los tubos en la centrifuga con la marca de orientación hacia afuera. Centrifugue los tubos durante **15 minutos** a **12,500-16,000g** a temperatura ambiente.
16. Retire el sobrenadante utilizando una pipeta desechable de transferencia con punta fina. Tenga cuidado de no tocar con la punta de la pipeta el pellet.
17. Añada **1000µL** de **etanol al 70%** (recién preparado) a cada tubo y mezcle en el vórtex.
18. Ponga los tubos en la centrifuga con la marca de orientación hacia afuera. Centrifugue durante **5 minutos** a **12,500-16,000g** a temperatura ambiente.

19. Retire el sobrenadante utilizando una pipeta desechable de transferencia con punta fina. Tenga cuidado de no tocar con la punta el pellet. Debe extraerse tanto sobrenadante como sea posible. Con la ayuda de una pipeta con punta de 200 μ L, retire el etanol que aún pueda haber quedado en el tubo. **Residuos de etanol pueden inhibir la amplificación.**
20. Añada a cada tubo **100 μ L** del diluyente **HIV-1 Dil** y mezcle vigorosamente en el vórtex durante 10 segundos.
21. Añada **50 μ L** de cada muestra y control procesado a su correspondiente tubo en el A-ring. No transfiera ningún material precipitado de las muestras. Cierre los tubos.
22. Lleve el A-ring a la zona de Post-PCR.

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN DE LA PROTEASA(PR) Y LA TRANSCRIPTASA REVERSA(TR) DEL GEN *pol*/ DEL VIH-1, EMPLEANDO PRIMERS CASEROS

Métodos

- 1) Fijación de plasma en discos de papel filtro (DPS)
- 2) Extracción de RNA del VIH
 - 2.1) A partir de plasma líquido
 - 2.2) A partir de DPS
- 3) Síntesis de cDNA
- 4) Amplificación del producto de 1096pb y 1023pb por PCR
- 5) Elaboración de gel de agarosa al 1% y electroforesis
- 6) Purificación del producto de PCR
- 7) Cuantificación del producto de PCR purificado
- 8) PCR de secuenciación del producto de 1023pb
- 9) Purificación del producto de secuenciación
- 10) Análisis de las secuencias de nucleótidos

1) Fijación de plasma en discos de papel filtro (DPS)

1. Rotular las tarjetillas con; nombre, fecha, temperatura de incubación y el tiempo.
2. Rotular sobre de papel Bond con; nombre, fecha y clave.
3. Limpiar la campana y todo el material que se va a utilizar con etanol al 70%.
4. Irradiar todo el material en la campana con rayos ultravioleta por 30 minutos (no colocar el tubo con sangre en la campana antes de irradiar.)
5. Centrifugar la muestra de sangre a 3.000 rpm a 4°C por 30 minutos para obtención del plasma.
6. Separar el plasma en tubo aparte
7. Tomar 50 µL de plasma y colocarlo en uno de los círculos, sin que se salpiquen las tarjetillas, ni se hagan burbujas. (aplicar 50 µL en 12 círculos, 2 tarjetillas de 6 círculos cada una).

8. Tomar las tarjetillas y realizar movimientos de arriba abajo por 15 segundos y ponerlas en la placa de papel lustre.
9. Dejar secar las tarjetillas en la campana de flujo laminar por dos horas.
10. Introducir la tarjetilla en un sobre de papel Bond previamente rotulado.
11. Colocar los sobres o sobre en una bolsa de plástico.
12. Colocar las bolsas en una bolsa de sellado hermético con desecantes.
13. Almacenar las muestra DPS elaboradas a -20°C hasta su análisis. Para las muestras DPS que ingresen al estudio de evaluación de temperaturas se deberá almacenar las muestras a -20°C, 4°C, temperatura ambiente y 37°C durante 7 días; después de este tiempo, todas las muestras se almacenarán a -20°C.
14. Limpiar todo el material utilizado con alcohol al 70% y volver irradiar la campana por 30 minutos.
15. Guardar el material no utilizado en su lugar.

MATERIAL REQUERIDO.

Bolsas de plástico (20cm X 10.5 cm).

Sobres de papel Bond. (13.5cm. X 8.5 cm.).

Papel filtro S & S # 903 (tarjetillas de 6 círculos libre de RNAsas).

1 placa de papel ilustración forrada con plástico 69X47 cm.

Guantes

Puntas con filtro de 200µL

Micropipeta de 200 µL.

Un contenedor de desecho (vaso de precipitados de plástico con bolsa).

Gasas estériles.

Soporte de pipetas.

Centrífuga

Plasma líquido 500 µL

Sobres Desecantes (Drierite Desiccant Bag W.A. Hammond Drierite Co. Ltd. Xenia, Ohio).

2) Extracción de RNA del VIH

2.1) Extracción de RNA de VIH a partir de plasma líquido

1. Preenfriar la centrifuga de alta velocidad a 4°C (30 min / 85-100 rpm)
2. Mezclar los plasmas en Vórtex de 3-5seg
3. Colocar **500 µl** de PLASMA a su tubo correspondiente
4. Preparar un **control positivo bajo**:
Combinar en un tubo eppendorf:
50µl de HIV-1 8E5 Control positivo y
450µl de HIV-1 E85 Control Negativo
- 5) Centrifugar a 21.000 – 25.000xg /4°C /1hora.
- 6) Retirar el sobrenadante.
- 7) Adicionar **600 µl** buffer de lisis (**HIV-Lys**), mezclar en vórtex de 3-5seg y dar un pin.
- 8) Incubar 10 min /° TA.

- 9) Adicionar **600 µl** de Isopropanol.
- 10) Mezclar muy bien en el Vórtex de 3-5seg
- 11) Centrifugar a 12.500-15.000 xg /°TA /15 min
- 12) Retirar el sobrenadante con Pipetas de transferencia de punta fina, evitando llevarse el pellet.
- 13) Adicionar **1000 µl** de Etanol al 70%
- 14) Mezclar muy bien en el Vórtex
- 15) Centrifugar a 12.500 – 15.000xg /°TA /5 min
- 16) Retirar el sobrenadante con Pipetas de transferencia de punta fina.
- 17) Resuspender cada pellet con diluyente de dilución (**RNA Dil**) en base a la siguiente tabla:

Si la CV es	Volumen (µl) de diluyente
> 15,000 copias/ml	100 µl
2000 – 15, 000	50 µl
Desconocido	50 µl
Controles	
Positivo	100 µl
Positivo bajo	50 µl
Negativo	50 µl

- 18) Mezclar muy bien en el Vórtex 10 seg, para resuspender la pellet.
- 19) Centrifugar a 2.000xg de 1-2seg.
- 20) Proceder a realizar la retrotranscripción (RT) ó guardar a-70°C

2.2) Extracción de RNA a partir de DPS (procedimiento de NucliSens)

- 1) Colocar **2 (100uL) círculos de plasma**, en el buffer de Lisis (9 ml).
- 2) Agitar 1500/1h/TA¹
- 3) Retirar los filtros con agujas estériles.
- 4) Adicionar **50µl de silica** (previamente agitada en vórtex) a c/u. de los tubos, (volver a mezclar la silica cada que se adicione a dos tubos).
- 5) Incubar 10 min a TA, mezclar cada 2 min.²
- 6) Centrifugar 1500rpm/2 min/TA.
- 7) Desechar el sobrenadante con pipeta de transferencia de pta. gruesa y al final con pipeta de pta. delgada
- 8) Adicionar **1 ml de buf. de lavado** a c/u de las pastillas.
- 9) Transferir a tubos eppendorf c/tapón de rosca, empleando una punta de 1ml.
- 10) Centrifugar 12,000rpm (max. vel.)/2 min/TA (centrifuga MICROSPIN 2)
- 11) Desechar el sobrenadante con pipeta de transferencia de pta. delgada.
- 12) Adicionar **1 ml de Buf de lavado**, agitar con vórtex hasta que se desprege la pastilla.
- 13) Centrifugar 12,000rpm (max. vel.)/2 min/TA (centrifuga MICROSPIN 2).

- 14) Desechar el sobrenadante con pipeta de transferencia de pta. delgada
- 15) Adicionar **1 ml de EtOH 70%**, agitar con vortex, hasta que se desprege la pastilla.
- 16) Centrifugar 12,000rpm (max. vel.)/2 min/TA (centrifuga MICROSPIN 2).
- 17) Desechar el sobrenadante con pipeta de transferencia de pta. delgada
- 18) Adicionar **1 ml de EtOH 70%**, agitar con vortex, hasta que se desprege la pastilla.
- 19) Centrifugar 12,000rpm (max. vel.)/2 min/TA (centrifuga MICROSPIN 2).
- 20) Desechar el sobrenadante con pipeta de transferencia de pta. delgada.
- 21) Adicionar **1 ml de acetona**, agitar con vortex, hasta que se desprege la pastilla.
- 22) Centrifugar 12,000rpm (max. vel.)/2 min/TA (centrifuga MICROSPIN 2).
- 23) Desechar el sobrenadante con pipeta de transferencia de pta. delgada
- 24) Centrifugar un pin (máximo 30 seg), en la picocentrífuga.
- 25) Eliminar el exceso de acetona, con una pipeta de transferencia de punta. delgada.
- 26) Incubar los tubos destapados a 56°C/10 min, cubriéndolos con una gasa estéril.
- 27) Revisar que la pastilla este seca.
- 28) Resuspender las pastillas con 60µl de buffer de elusión.
- 29) Agitar con vórtex, hasta despegar la pastilla.
- 30) Incubar a 56°C/10 min, agitar con vórtex c/5min
- 31) Centrifugar 12.000 rpm (vel. max.)/2 min.
- 32) LISTO EL RNA DE HIV POR NucliSens SIN CALIBRADOR

Material necesario:

- Recipientes para desecho; recipiente para agujas; 12 agujas, 2 jeringas, camisas para centrifuga.
- Sacar del refrigerador los reactivos (Buffer de elución, el buffer de lavado, sílica) media hora antes de iniciar la extracción.
- Cuando falte media hora: acomodar la campana: Papel Kraft; 84 p. de transferencia de punta fina y 12 gruesa; micropipetas de 40, 200, 1000µl, porta micropipetas, puntas de 1000 (2 racks), 200, y 100 µl; tubos eppendorf de tapón de rosca.
- Preparar EtOH 70% (22 ml de EtOH absoluto + 8 ml de agua desionizada estéril.
- Alicuotar la acetona (1 ml por muestra).
- Alicuotar 20 ml de buffer de Lavado.

3) Síntesis de cDNA

Preparación de la muestra de RNA.

- 1) Colocar 10pg-1ug de RNA en un tubo eppendorf estéril libre de nucleasas en un volumen de 10uL
- 2) Calentar a 75°C/5min.
- 3) Inmediatamente después transferir a hielo (choque frío)

Preparación de la reacción de síntesis de la primera cadena o cDNA

Reactivos	[Stock]	μl/rxn	[final]	_____x
Buffer de RT	5X	5	1X	
dNTPS	10mM	2.5	1mM c/u	
Inhibidor de Ribonucleasa (RNasin)		0.5	0.8U/ul (20U)	
AMV RT	10U/ul	0.5	0.2 U/ul (5U)	
Oligo dT	0.5ug/ul	1.0	0.02 ug/ul (0.5 ug)	
Agua inyectable		5.5		
		25		

- 1) Adicionar a la mezcla de reacción el RNA desnaturalizado y mezclar
- 2) Incubar a 37°C/1 h, luego inactivar calentando a 95°C/5 min.
- 3) Colocar en hielo y adicionar 75ul de agua inyectable libre de nucleasas.
- 4) Alicuotar.

4) Amplificación del producto de 1096pb (1ra PCR) y 1023pb (2da PCR)

Para amplificar el cDNA, se realizara PCR y se emplearan los siguientes pares de oligonucleotidos:

1096pb

Sentido: Pro-Out.3F: 5'-CCT CAG ATC ACT CTT TGG CAA CG -3'

Antisentido: RT gen.4R: 5'-ATC CCT GCA TAA ATC TGA CTT GC -3'

1023pb

Sentido: PR/RT.2F: 5'-GAT CAC TCT TTG GCA ACG ACC CAT -3'

Antisentido: 215/219.3R: 5'-CTT CTG TAT GTC ATT GAC AGT CC -3'

1ra PCR fragmento 1096pb (Primers: Pro Out.3F/RT gen.4R)

Materiales para la campana de flujo laminar

- Bata limpia
- Guantes
- Gradilla para tubos de PCR
- Gradilla para tubos de 1.5mL
- Recipiente para desechar puntas
- Hielo
- Vórtex
- Microcentrifuga

Micropipetas 2ul(0.2-2ul), 10ul (1-10ul), 20ul(2-20ul),40ul(5-40ul), 200ul(20-200ul)
 Puntas con filtro de 10ul, 20ul, 200ul
 Tubos para PCR (200ul)
 Reactivos de PCR
 Vial de agua inyectable
 Gradilla para tubos de PCR (afuera de la campana)

Material para la mesa de trabajo

Micropipeta 10ul
 Puntas con filtro de 10ul
 Recipiente para desechar puntas
 Hielo
 Gradilla para tubos de 1.5ml
 Muestras de cDNA o producto de PCR externo
 NOTA 1: Todos los reactivos, excepto el agua, se almacenan a -20°C
 NOTA 2: El RNA se almacena a -70°C en alícuotas de 10ul en tubos libres de RNAsas (tubos de PCR)
 NOTA 3: Los productos de PCR se guardan a -20°C
 NOTA 4: No se debe mezclar en el Vórtex el reactivo Taq DNA polimerasa

Procedimiento

Irradiar campana con luz UV 10 a 15 min previos, abriendo caja de puntas
 Realizar la mezcla de PCR según la tabla siguiente:

Reactivos	(Stock)	ul/rxn	(final)	rxn
Reacción de cDNA		10ul	<10ng/ul	
Buffer de PCR	10X	2.5	1X	
Primers F (Pro Out.3F)	50pmol/ul	0.5	0.4uM	
Primers R (RT gen.4R)	50pmol/ul	0.5	0.4uM	
Taq DNA pol *	5U/ul	0.5	2.5U	
Agua		11		
Vol final		25		

Termociclador ____ Biometra _____

94°C/2min
 40 ciclos:
 Desnaturalización 94°C/15seg
 Alineamiento 50°C/30seg
 Extensión 72°C/1min
 72°C/10min
 4°C

2da PCR (Interna o anidada) fragmento de 1023pb (Primers: PR/RT.2F y 215/219.3R)

Reactivos	(Stock)	ul/rxn	(final)	_____rxn
Producto de PCR_1096pb_____		4.0		
Dntps	10mM	0.5	200uM	
MgCl ₂	30mM	1.6	2mM	
Buffer de PCR	10X	2.5	1X	
Primers F(PR/RT.2F)	5pmol/ul	0.5	0.4uM	
Primers R(215/219.3R)	5pmol/ul	0.5	0.4uM	
Taq DNA pol	5U/ul	0.5	2.5U	
Agua		14.9		
Vol final		25		

Termociclador_____Biometra_____

94°C/2min

40 ciclos:

Desnaturalización

94°C/15seg

Alineamiento

57°C/30seg

Extensión

72°C/1min

72°C/10min

4°C

Una vez cargado el tubo mix con los reactivos correspondientes, dividir la mezcla de PCR en los tubos correspondientes para el número de reacciones calculados en la tabla

Cerrar los tubos de PCR que contienen el mix

Apagar el flujo de la campana, cerrar los racks de las puntas, desechar las puntas usadas

Sacar las gradillas con los tubos que tienen el mix de la campana

Irradiar la campana de flujo laminar durante 10 min

Llevar los tubos de PCR que contienen el mix a la mesa del laboratorio

Adicionar el cDNA o producto de PCR al mix de PCR

Cerrar los tubos de PCR y meter al termociclador

Una vez finalizado el PCR, almacenar las reacciones a -20°C.

5) Elaboración de Gel de agarosa al 1% y Electroforesis

PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA AL 1% (Volumen 50mL*)

1. Preparar los moldes para preparar el gel (limpiar y colocar peines)
2. Pesar 0.5g de agarosa en frasco de 80ml
3. Adicionar 30ml de agua desionizada
4. Agitar frasco, aflojar la tapa del frasco y fundir en horno de microondas por 1 a 2min, con pausas
5. Adicionar 15ml de agua desionizada y 5ml de TBE 10X
6. Esperar unos minutos a que baje la temperatura del frasco (T°, aprox 35 °C)

7. Adicionar 5ul de Bromuro de Etidio (10mg/ml), 10ul si la presentación es 5mg/ml
8. Tapar frasco y homogeneizar (sin emitir vapores o burbujas)
9. Vertir sol. Agarosa en los moldes de gel
10. Esperar entre 10-20min a que se solidifique (gelifique)

*La cantidad de agarosa, agua desionizada, TBE 10X y bromuro de Etidio varía según el volumen que se vaya a preparar.

ELECTROFORESIS horizontal de DNA en geles de agarosa

1. El gel de agarosa se coloca en la cámara de electroforesis horizontal (Gibco BRL Horizon 58)
2. Se llena la cámara de electroforesis con amortiguador de electroforesis TBE 1X hasta que cubra el gel
3. Se mezcla el producto de PCR con el buffer de carga 6X a una concentración final de 1X (Ej: 0.6ul de buffer de carga 6X con 4ul de la muestra)
4. Cargar la muestra en los pozos del gel y al final cargar 3.5ul (dil 1:10) del marcador de 100pb.
5. Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder a 70v/30min, verificar el intercambio de iones que indica que la electroforesis se está llevando a cabo correctamente.
6. Apagar la fuente de poder y desconectar los cables de la cámara de electroforesis
7. Tomar el gel de la cámara de electroforesis usando la pala de uso exclusivo para el bromuro de Etidio.
8. Observar el gel bajo luz UV usando el documentador(transiluminador) de geles (Programa GeneSnap from SynGene SYNGENE. Copyright Synoptics Ltd 1993-2003. Versión 6.03.00.
9. Capturar la imagen en el software SynGene
10. Exportar y editar la imagen

(*) Ver Preparación de soluciones

CORTE DEL SEGMENTO DE AGAROSA QUE CONTIENE EL FRAGMENTO AMPLIFICADO

Material

Gradilla 1.5ml

Tubos eppendorf de 1.5ml

Gasas

Navaja

Frasco con agua

Gel de agarosa con los productos de PCR que se purificarán

Máscaras de protección contra luz UV

Procedimiento

Limpiar transiluminador

Colocar el gel de agarosa

Proteger la vista de la luz UV usando una máscara de protección

Encender el transiluminador

Cortar el gel que contiene los fragmentos de DNA del tamaño adecuado

Colocar las bandas cortadas en tubos eppendorf de 1.5ml

Proteger las bandas cortadas con papel aluminio y proseguir a purificar el fragmento de PCR o conservar a -20°C.

6) Purificación del producto de PCR

I. Purificación de producto de PCR usando Pure Link kit™ Invitrogene

Cuando el producto de PCR, tiene sólo la banda de tamaño esperado y no otras bandas inespecíficas, se realizará la purificación directa, de modo que no se tiene que realizar una electroforesis y posteriormente obtener sólo la banda del tamaño esperado.

Purificación directa del PCR:

1. Adicionar 4 volúmenes del Buffer de unión apropiado, a 1 vol de Prod PCR (50-100µl). Mezclar bien.
 - a. Binding buffer(B2). Purificar Fragmentos de PCR dsDNA 100pb-12kb
 - b. Binding buffer(HC). Remove Primer dimer o productos de PCR cortos (>300pb)
2. Transferir a la columna del kit de PURE LINK™ Invitrogene .
3. Centrifugar a 10,000 x g / 1 min. Desechar el eluido.
4. Adicionar 650 µl de Buffer de lavado.
5. Centrifugar 10,000 x g 1 minuto, desechar el eluido.
6. Volver a centrifugar 3 min a máxima velocidad (16,100Xg).
7. Transferir la columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril
8. Eluir con 30 µl de H₂O inyectable e incubar 1 min a T°A.
9. Centrifugar a vel máxima (16,1000) Xg/2 min.
10. Si se desea incrementar el vol eluido, repetir el paso 8 y 9.

II Purificación de productos de PCR a partir del gel de agarosa con el kit QIAquick gel Extraction (QIAGEN).

Cuando se obtienen productos inespecíficos adicionales a la banda esperada, se realiza la purificación de la muestra mediante este procedimiento, el cual previamente necesita el corrimiento electroforético de los productos del PCR y posteriormente la purificación.

1. Cortar la banda del gel, colocarla en un tubo eppendorf de 1.5 ml y pesarla
2. Adicionar 3 volúmenes de buffer QG con respecto al peso del segmento de agarosa.
3. Incubar a 56°C/10 min con agitación constante.
4. Adicionar un volumen de Isopropanol
5. Transferir la solución a la columna y centrifugar a 10,000 rpm/1min.
6. Adicionar 500µl buffer QG y se centrifugar a 10,000 rpm/1min
7. Adicionar 750 µl de buffer PE y centrifugar 10,000 rpm/1min
8. Centrifugar a 13,000 rpm/1 min para eliminar el exceso de etanol.
9. El producto de PCR se eluye con 50µl de buffer EB y se centrifuga a 13,000 rpm/1 min.

7) Cuantificación del producto de PCR purificado.

-Empleando el espectrofotómetro *Nanodrop*:

Una vez calibrado el Nanodrop, tomar 1uL del producto purificado y leerla en el nanodrop a 260 nm, el equipo da los resultados de la concentración en ng/µl.

-Empleando un marcador de masa molecular.

Se realiza una electroforesis de los productos purificados (como se indica en la sección 5) pero cargando un marcador de masa molecular.

8) PCR de secuenciación del producto de 1023pb

La reacción de secuenciación, se realizará empleando el sistema de Big Dye Terminador v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems), 1X de Mix, 3.2 pmol/ μ l del iniciador interno, 50 ng del producto de PCR 1023pb purificado, 20 μ l de agua desionizada. Se realizará 25 ciclos de amplificación de secuenciación a 96°C/10 seg, 50°C/5 seg y 60°C/4 min.

9) Purificación del producto de secuenciación

Para eliminar los terminadores que no fueron incorporados en la reacción de secuenciación, los productos secuenciados se purificarán empleando el siguiente procedimiento:

- Transferir 20uL de tubo PCR a tubo de 1.5mL y adicionar 16uL de H₂O y 64uL de etanol al 95% preparado en ese momento
- Incubar tubos a T° ambiente cubiertos con papel aluminio por 15 min y centrifugar a máxima velocidad por 20min (marcando sitio de tubo para centrifugar)
- Retirar sobrenadante con precaución
- Mientras se centrifuga preparar solución de etanol al 70% (stock=etanol al 95%)
 - o Ej: Debo adicionar 250uL de etanol al 70%
 - o Si tengo 8 tubos redondeo a 10 reacciones: $250 \times 10 = 2.5\text{mL} \times 70\text{uL}/95\% = 1.8\text{mL}$ de etanol al 95%. Agrego 0.7mL (700uL) de H₂O para completar volumen de 2.5mL y dividimos en 2 tubos (tubos de 2mL)
- Una vez adicionado los 250uL de etanol al 70% se mezcla en el vórtex y se centrifuga por 10min a máxima velocidad
- Aspirar sobrenadante con precaución
- Colocar los tubos en el Concentrador 5301, (abiertos para que se evapore el etanol restante) por 7 min a 45°C para su liofilización.
- Retirar tubos y cubrirlos con papel aluminio (para proteger del sol)
- Listas las muestras para secuenciar o en caso contrario guardar las muestras a -20°C.

10) Análisis de las secuencias de nucleótidos

Obtenidos los electroferogramas, donde se muestra la secuencia del fragmento de 1023pb, se analiza la secuencia por medio del programa computarizado CLC Main Workbench versión 6.0 (URL:<http://www.clcbio.com/index.php?id=92>), donde se realiza el consenso de la secuencia final usando la secuencia *forward* y la *reverse* de la misma muestra, y obteniendo así el número de nucleótidos de dicha muestra, la cual ya se encuentra lista para el análisis de farmacoresistencia.

Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos de la muestra en plasma líquido o de la muestra en DPS se procede a ingresar a la página de la Universidad de Stanford de acceso libre en internet: *HIV Drug Resistance Database* (URL: <http://hivdb.stanford.edu/>) donde se copia la secuencia consenso de nuestras muestras en el *HIVdb program* para la interpretación de los genotipos de farmacorresistencia de las muestras analizadas. Este programa ofrece un reporte de farmacorresistencia por medio de una interpretación sobre las mutaciones del VIH asociadas a resistencia a los medicamentos ARVs e identifica el subtipo del VIH.

Referencias

1. UNAIDS. Global HIV/AIDS epidemic. UNAIDS fact sheet, 2001:1-29.
2. Oguntibeju O, van den Heever W, Van Schalkwyk F. A review of the epidemiology, biology and pathogenesis of HIV. *J Biol Sci* 2007; 7: 1296-1304.
3. E. Scherer E, Douek† D, McMichael A. 25 years of HIV research on virology, virus restriction, immunopathogenesis, genes and vaccines. *British Society for Immunology. Clin Exper Immunol* 2008; 154: 6–14.
4. Simon V, Ho D, Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* 2006; 368: 489–504.
5. AIDS epidemic update. UNAIDS, WHO. 2007.
6. UNAIDS. Outlook report 2010.
7. Bagasra O, Hauptman SP, Lischener HW. Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus on mononuclear cells by in situ polymerase chain reaction. *New Engl. J. Med* 1992; 326: 1385-1391.
8. Paxon WA, Martin SR, Tse D. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple sexual exposures. *Nature Med* 1996; 2:412-417.
9. Greene WC. AIDS and the immune system. *Sci. Am.* 1993;269:98–105.
10. Fauci AS. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Sci.* 1988;239:617–22.
11. Stine GJ. AIDS Update 2000: An Annual Overview of Acquired Immune Deficiency Syndrome. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall. 2000: 486pp.
12. Weiss R. HIV receptors and the pathogenesis of AIDS. *Sci.* 1996; 271: 1885-1886.
13. Dimmock NJ, Primrose SB. Introduction to Modern Virology. Oxford: Blackwell Sci. 1987: 362 pp.
14. Wills JW, Craven R. Form, function, and use of retroviral Gag protein. *AIDS* 1991;5:639–54.
15. Rosen CA. Regulation of HIV gene expression by RNA-protein interactions. *Trends Genet* 1991;7:9–14.
16. Somasundaran M, Robinson HL. Unexpectedly high levels of HIV-1 RNA and protein synthesis in a cytotoxic infection. *Sci.* 1988;242:1554–56.
17. Bonhoeffer S, Holmes EC, Nowak MA. Causes of HIV diversity. *Nature* 1995;376:125.
18. Korber B, Theiler J, Wolinsky S. Limitations of a molecular clock applied to considerations of the origin of HIV-1. *Sci.* 1998; 280:1868–71.
19. Hutchinson J. The Biology and Evolution of HIV. *Annu. Rev. Anthropol.* 2001; 30:85–108.
20. World Health Organization, United Nations Children's Fund, UNAIDS, 2009.

21. Kilsztajn S, Lopes E, do Carmo M, Rocha P. Improvement in survival among symptomatic AIDS patients by exposure category in Sao Paulo. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45:342–347.
22. Mermin J, Were W, Ekwaru JP, Moore D, Downing R, Behumbiize P, Lule J, Coutinho A, Tappero J, Bunnell R. Mortality in HIV-infected Ugandan adults receiving antiretroviral treatment and survival of their HIV-uninfected children: a prospective cohort study. *Lancet* 2008;371:752–759.
23. Violari A, Cotton M, Gibb D, Babiker A, Steyn J, Madhi Sh, Jean-Philippe P, McIntyre J. Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. *N Eng J Med* 2008;359:2233–2244.
24. AIDS epidemic update : November 2009.
25. U.S. Food and Drug Administration: Drugs used in the treatment of HIV Infection. Online at: <http://www.fda.gov/oashi/aids/virals.html>.
26. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection February 23, 2009.
27. DeGruttola V, Dix L, D Aquila R, Holder D, Phillips A, Ait-Khaled M, Baxter J, Clevenbergh P, Hammer S, Harrigan R, Katzenstein D, Lanier R, Miller M, Para M, Yerly S, Zolopa A, Murray J, Patick A, Miller V, Castillo S, Pedneault L, Mellors J. The relation between baseline HIV drug resistance and response to antirretroviral therapy: re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan. *Antivir. Ther* 2000; 5, 41-48.
28. Battula N, Loeb L. On the fidelity of DNA replication. Lack of exodeoxyribonuclease activity and error-correcting function in avian myeloblastosis virus DNA polymerase. *J Biol Chem.* 1976;251:982-986.
29. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel T. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Sci.* 1988;242:1171-3.
30. Frenkel LM, Tobin NH. Understanding HIV-1 drug resistance. *Ther. Drug Monit* 2004; 26: 116–121.
31. Richman DD, Morton SC, Wrin T. The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States. *AIDS* 2004;18:1393-1401.
32. Zhang M, Han XX, Cui WG, Jia MH, Meng XD, Xing AH, Wu YH, Yang YY, Lu CM, Hu QH, Dai D, Zhang ZN, Shang H. The impacts of current antiretroviral therapy regimens on Chinese AIDS patients and their implications for HIV-1 drug resistance mutations. *Jpn. J. Infect. Dis* 2008; 61:361-365.
33. Cane PA. Stability of transmitted drug-resistant HIV-1 species. *Curr. Opin. Infect. Dis* 2005; 18: 537–542.
34. Johannessen A, Marius Trøseid M, Calmy A. Dried blood spots can expand access to virological monitoring of HIV treatment in resource-limited settings. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 1126–1129.

35. Secretaría de Salud. Consejo Nacional para la Prevención y Control del Sida Conasida. Guía de Manejo Antirretroviral de las personas con VIH. 4ª edición. México 2009.
36. Rhee SY, Gonzalez MJ, Kantor R, Betts B, Ravela J, Shafer R. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* 2003;3: 298-303.
37. Mwaba P, Casso SHI, Nunn A, Pilon R, Chintu Ch, Janes M, Zumla A. Whole blood versus plasma spots for measurement of HIV-1 viral load in HIV-infected African patients. *Lancet* 2003; 362: 2067–68.
38. Mbida A, Sosso S, Flori P, Saoudin H, Lawrence P, Monny-Lobé M, Oyono Y, Ndzi E, Cappelli G, Lucht F, Pozzetto B, Oukem-Boyer O, Bourlet T. Measure of viral load by using the Abbott Real-Time HIV-1 assay on dried blood and plasma spot specimens collected in 2 rural dispensaries in Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;52:9-16.
39. Brambilla D, Jennings Ch, Aldrovandi G, Bremer J, Comeau A, Cassol S, Dickover R, Jackson B, Pitt J, Sullivan J, Butcher A, Grosso L, Reichelderfer P, Fiscus S. Multicenter Evaluation of Use of Dried Blood and Plasma Spot Specimens in Quantitative Assays for Human Immunodeficiency Virus RNA: Measurement, Precision, and RNA Stability. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1888-1893.
40. Mwaba P, Cassol S, Pilon R, Chintu C, Janes M, Nunn A, Zumla A.. Use of dried whole blood spots to measure CD4+ lymphocyte counts in HIV-1-infected patients. *Lancet* 2003; 362: 1459–60.
41. Hallack R, Doherty LE, Wethers JA, Parker MM. Evaluation of dried blood spot specimens for HIV-1 drug-resistance testing using the Trugene HIV-1 genotyping assay, *J Clin Virol.* 2008; 41: 283-287.
42. Buckton AJ, Prabhu DP, Cane PA, Pillay D. No evidence for crosscontamination of dried blood spots excised using an office hole-punch for HIV-1 drug resistance genotyping *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;63: 615-616.
43. Fiscus SA, Brambilla D, Grosso L, Schock J, Cronin M. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by using blood dried on filter paper. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 258–60.
44. Leelawiwat W, Young NL, Chaowanachan T, Ou CY, Culnane M, Vanprapa N, Waranawat N, Wasinrapee P, Mock PA, Tappero J, McNicholl JM. 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. *J Virol Methods* 2009; 155: 109–17.
45. Youngpairoj A, Masciotra S, Garrido C, Zahonero N, Mendoza C, García-Lerma J. HIV-1 drug resistance genotyping from dried blood spots stored for 1 year at 4°C. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:1217–1220.
46. García-Lerma J, McNulty A, Jennings Ch, Huang D, Heneine W, Bremer J. Rapid decline in the efficiency of HIV drug resistance genotyping from dried

- blood spots (DBS) and dried plasma spots (DPS) stored at 37°C and high humidity. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:33–36.
47. Mwaba P, Casso SH, Nunn A, Pilon R, Chintu Ch, Janes M, Zumla A. Whole blood versus plasma spots for measurement of HIV-1 viral load in HIV-infected African patients. *Lancet* 2003; 362: 2067–68.
 48. Alvarez-Muñoz M, Zaragoza-Rodríguez S, Rojas-Montes O, Palacios-Saucedo G, Vázquez-Rosales G, Gómez-Delgado A, Torres J, Muñoz O. High correlation of Human Immunodeficiency Virus Type-1 viral load measured in dried-blood spot samples and in plasma under different storage conditions. *Arch Med Res* 2005;36: 382-386.
 49. 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. Genotypic testing for HIV-1 drug resistance using dried blood samples. *Arch Virol.* 2010; 155:1117-25..
 50. Bertagnolio S, Soto-Ramirez L, Pilon R, Rodriguez R, Viveros M, Fuentes L, Harrigan P, Mo T, Sutherland D, Sandstrom P. HIV-1 drug resistance surveillance using dried whole blood spots. *Antivir Ther.* 2007; 12: 107-113.
 51. Hammer SM, Eron JJ Jr, Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S, Cahn P, Fischl MA, Gatell JM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Montaner JS, Richman DD, Yeni PG, Volberding PA. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2008; 300: 555–70.
 52. Hamers R, Smit P, Stevens W, Schuurman R, Rinke de Wit T. Dried fluid spots for HIV type-1 viral load and resistance genotyping: a systematic review. *Antivir Ther.* 2009; 14:619-629.
 53. Johannessen A. Dried blood spots in HIV monitoring: applications in resource-limited settings. *Bioanalysis* 2010; 2: 1893–1908.
 54. The EuroGuidelines Group for HIV resistance. Clinical and laboratory guidelines for the use of HIV-1 drug resistance testing as part of treatment management: recommendations for the European setting. *AIDS* 2001;15:309-20.
 55. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila RT. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* 2003;37:113-28.
 56. UNAIDS, WHO. 2008 Report on the global AIDS epidemic. Available from http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/2008_Global_report.asp.
 57. van Oosterhout JJ, Brown L, Weigel R, Kumwenda J, Mzinganjira D, Saukila N, Mhango B, Hartung T, Phiri S, Hosseinipour M. Diagnosis of antiretroviral therapy failure in Malawi: poor performance of clinical and immunological WHO criteria *Trop. Med. Int. Health* 2009;14:856–861.
 58. Mee P, Fielding KL, Charalambous S, Churchyard GJ, Grant AD. Evaluation of the WHO criteria for antiretroviral treatment failure among adults in South Africa. *AIDS* 2008;22:1971–1977.

59. Cassol S, Gill M, Pilon R, Cormier M, Voigt R, Willoughby B, Forbes J. Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA from Dried Plasma Spots Collected on Filter Paper. *J Clin Microbiol* 1997;35:2795-2801.
60. Johannessen A, Garrido C, Zahonero N, Sandvik L, Naman E, Kivuyo S, Kasubi M, Gundersen S, Bruun J, Mendoza C. Dried Blood Spots Perform Well in Viral Load Monitoring of Patients Who Receive Antiretroviral Treatment in Rural Tanzania. *Clin Infect Dis* 2009; 49:976–81.
61. Garrido C, Zahonero N, Corral A, Arredondo M, Soriano V, Mendoza C. Correlation between Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA Measurements Obtained with Dried Blood Spots and Those Obtained with Plasma by Use of Nuclisens EasyQ HIV-1 and Abbott Real Time HIV Load Tests. *J Clin Microbiol* 2009;47:1031-1036.
62. Diedonné A, Sosso S, Flori P, Saoudin H, Lawrence Ph, Monny-Lobé M, Oyono Y, Ndzi E, Cappelli G, Lucht F, Pozzetto B, Oukem-Boyer O, Bourlet T. Measure of viral load by using the Abbott Real-Time HIV-1 assay on dried blood and plasma spot specimens collected in 2 rural dispensaries in Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;52:9-16.
63. Reigadas S, Schrive M, Aurillac-Lavignolle V, Fleury H. Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood and plasma spots. *J Virol Meth* 2009;161:177–180.
64. Amellal B, Katlama C, Calvez V. Evaluation of the use of dried spots and of different storage conditions of plasma for HIV-1 RNA quantification. *HIV Med* 2007;8:396–400.
65. Andreotti M, Pirillo M, Guidotti G, Ceffa S, Paturzo G, Germano P, Luhanga R, Chimwaza D, Mancini M, Marazzi M, Vella S, Palombi L, Giuliano M. Correlation between HIV-1 viral load quantification in plasma, dried blood spots, and dried plasma spots using the Roche COBAS Taqman assay. *J Clin Virol* 2010;47: 4–7.
66. Masciotra S, Garrido C, Youngpairoja Ae, McNulty A, Zahonerob N, Corral A, Heneine W, Mendoza C and Garcia-Lerma G. High concordance between HIV-1 drug resistance genotypes generated from plasma and dried blood spots in antiretroviral-experienced patients. *AIDS* 2007; 21:2503–2511.
67. Monleau M, Butel Ch, Delaporte E, Boillot F, Peeters M. Effect of storage conditions of dried plasma and blood spots on HIV-1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance genotyping. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1562-6.
68. Hearps A, Ryan C, Morris L, Plate M, Greengrass V, Crowe S. Stability of Dried Blood Spots for HIV-1 Drug Resistance Analysis. *Curr HIV Res* 2010; 8:134-140.
69. McNulty A, Jennings C, Bennett D, Fitzgibbon J, Bremer J, Ussery M, Kalish M, Heneine W, García-Lerma J. Evaluation of Dried Blood Spots for HIV-1 Drug Resistance Testing. *J. Clin. Microbiol* 2007;45: 517–521.

70. Steegen K, Luchters S, Demecheleer E, Dauwe K, Mandaliya K, Jaoko W, Plum J, Temmerman M, Verhofstede C. Feasibility of Detecting Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance in DNA Extracted from Whole Blood or Dried Blood Spots. *J Clin. Microbiol* 2007;45:3342-3351.
71. Yang C, McNulty A, Diallo K, Zhang J, Titanji B, Kassim S, Wadonda-Kabondo N, Aberle-Grasse J, Kibuka T, Ndumbe P, Vedapuri S, Zhou Z, Chilima B, Nkengasong J. Development and application of a broadly sensitive dried-blood-spot-based genotyping assay for global surveillance of HIV-1 drug resistance. *J. Clin. Microbiol* 2010;48:3158-3164.
72. Monleau M, Montavon C, Laurent C, Segondy M, Montes B, Delaporte E, Boillot F, Peeters M. Evaluation of Different RNA Extraction Methods and Storage Conditions of Dried Plasma or Blood Spots for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Quantification and PCR Amplification for Drug Resistance Testing. *J. Clin. Microbiol* 2009;47:1107-1118.
73. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci* 1994; 39: 362-372.
74. Bi X, Gatanaga H, Ida S, Tsuchiya K, Matsuoka-Aizawa S, Kimura S, Oka S. Emergence of protease inhibitor resistance-associated mutations in plasma HIV-1 precedes that in proviruses of peripheral blood mononuclear cells by more than a year. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34:1-6.
75. World Health Organization (WHO). Rapid advice: antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. WHO, Geneva, Switzerland 2009.
76. Dachraoui R, Depatureaux A, Chakroun M, Fodha I, Letaief A, Trabelsi A, Simon F, Plantier J. Monitoring of HIV-1 resistance in Tunisia (North Africa) with a dried plasma spot strategy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;47:522-525.
77. Buckton A. New methods for the surveillance of HIV drug resistance in the resource poor world. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21:653–658.