



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN GENOTÍPICA  
DEL TROPISMO DEL VIH-1 A PARTIR DE MANCHAS  
SECAS DE PLASMA Y SANGRE EN PAPEL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**MARÍA CRISTINA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: M. C. LUIS ENRIQUE SOTO RAMÍREZ**

**ASESOR INTERNO: M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE**

**HERNÁNDEZ VÁZQUEZ**

**MÉXICO D.F. MAYO 2016**





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.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN GENOTÍPICA  
DEL TROPISMO DEL VIH-1 A PARTIR DE MANCHAS  
SECAS DE PLASMA Y SANGRE EN PAPEL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**MARÍA CRISTINA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: M. C. LUIS ENRIQUE SOTO RAMÍREZ**

**ASESOR INTERNO: M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE**

**HERNÁNDEZ VÁZQUEZ**

**MÉXICO D.F. MAYO 2016**



**Dedicado a:**

Mi mamá Martha Inés, gracias manzanita por nunca dudar de mí y por alentarme a tomar retos cada vez más grandes con aplomo y valor, pero sobre todo por hacerme una mujer independiente y autosuficiente en mi vida.

A mi papá Jesús, que aun cuando llegaste tarde a mi vida no mermo de ninguna manera el impacto que has tenido en ella, gracias por enseñarme de dónde vengo, quien soy y a donde voy.

A mis primos Uriel, Miguel y Paloma por su alegría y calidez que siempre me hizo sonreír incluso en los momentos más difíciles, por inspirarme a seguir adelante y por qué fueron parte importante de este ciclo.

A Norma, mi "Geno" quien es mi mamá disfrazada de tía, siempre agradeceré tu manera particular de querer y también que estuviste al pendiente de mi a cada instante.

A Paolo y Adriana quienes hicieron crecer mi familia, espero poder ser alguien positivo en su vida.

A la familia Cervantes por brindarme siempre su apoyo, recibirme en su familia y por haber compartido conmigo momentos muy gratos.

A Cristian quien me impulso de forma curiosa a ser dedicada y dar mi mejor esfuerzo, por ser una gran motivación, mi mejor amigo y el compañero con quien quiero compartir todas mis alegrías.

## **Agradecimientos**

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, al Departamento de Enseñanza y al Departamento de Infectología Laboratorio de Virología Molecular por el apoyo otorgado en mi proyecto de investigación dentro de sus instalaciones.

Al M. C. Luis Enrique Soto Ramírez por confiar en mí y brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación, por contribuir a mi formación profesional y por motivarme siempre a seguir adelante.

Al Biólogo Roberto A. Rodríguez Díaz por ayudarme de manera incondicional a hacer posible este proyecto dentro del laboratorio, gracias por integrarme en tu equipo de trabajo, por tu paciencia infinita y por tu acidez, me has regalado valiosas experiencias y lecciones de vida porque “ahí está el detalle”.

A mis compañeros de laboratorio Q.F.B. Ana Lilia López Filorio, Biol. Exp. Mario Hernández Flores, Q.F.B. Edder Mendoza Guadarrama y Q.F.B. Jhoanna Gómez Cuellar por su apoyo dentro del proyecto y en mi formación personal y profesional.

A la Dra. Luz Elena Cervantes Villar quien me dio ese “empujoncito” y ánimos cuando más lo necesite, agradezco enormemente su apoyo y los consejos que compartió conmigo.

Al M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez por aceptar ser mi sinodal y asesor interno de esta investigación, gracias por las atenciones y tiempo para ayudar a concluir este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a los profesores y a cada uno de mis sinodales por ayudarme a mejorar la calidad de este trabajo, por sus consejos y por el tiempo dedicado.

## INDICE

Resumen	
1. Introducción.....	1
1.1. Características virales.....	2
1.2. Tropismo.....	4
1.3. Manejo Clínico.....	7
1.4. DPS y DBS.....	10
2. Planteamiento del problema.....	11
3. Justificación.....	11
4. Hipótesis.....	13
5. Objetivos.....	13
6. Material y método.....	14
6.1. Criterios de inclusión.....	14
6.2. Obtención del plasma .....	15
6.3. Elaboración del DBS.....	15
6.4. Elaboración del DPS.....	15
6.5. Extracción de ARN viral.....	16
6.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	18
6.6.1. RT-PCR.....	18
6.6.2. PCR-Anidado.....	19
6.6.3. Análisis de los productos de PCR.....	20
6.7. Purificación de productos de PCR con Columnas Millipore.....	21
6.8. Marcaje con BigDye Terminator versión 3.1.....	22
6.9. Purificación de productos del marcaje.....	23
6.10. Secuenciación.....	23
6.11. Análisis de secuencia (SeqScape v2.5).....	24
6.12. Algoritmo Geno2Pheno.....	24
6.13. Algoritmo PSSM.....	25
6.14. Sensibilidad y especificidad.....	25
6.15. Espacio ROC.....	27
7. Resultados.....	28
8. Discusión.....	37
9. Conclusiones.....	39
10. Referencias Bibliográficas.....	41

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Porcentaje de las vías de transmisión del VIH-1 en México.....	2
<b>Figura 2.</b> Esquema de la estructura del VIH-1.....	2
<b>Figura 3.</b> Estructura genómica del VIH-1 y organización de los genes estructurales ( <i>pol</i> , <i>gag</i> y <i>env</i> ), genes reguladores ( <i>tat</i> y <i>rev</i> ) y los genes accesorios ( <i>nef</i> , <i>vpr</i> , <i>vpu</i> y <i>vif</i> ).....	3
<b>Figura 4.</b> Ciclo de replicación del VIH-1.....	4
<b>Figura 5.</b> Tropismo, receptor y correceptores utilizados por el VIH-1 para entrar a la célula blanco.....	5
<b>Figura 6.</b> Tropismo viral del VIH-1 determinado por el uso de los correceptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4.....	6
<b>Figura 7.</b> Ciclo de replicación del VIH y objetivos de la terapia antirretroviral.....	8
<b>Figura 8.</b> Instrucciones de la preparación del Chip Agilent DNA 7500.....	21
<b>Figura 9.</b> Tabla de Contingencia 2x2 para evaluar pruebas diagnósticas.....	26
<b>Figura 10.</b> Ejemplo de un gráfico ROC de un test hipotético.....	28
<b>Figura 11.</b> Curva de la CV mínima detectada en DPS extraídos después de 48 horas de almacenados.....	29
<b>Figura 12.</b> Curva de CV mínima detectada en DPS extraídos después de 1 semana de almacenados.....	30
<b>Figura 13.</b> Grafica del espacio ROC que muestra la especificidad y sensibilidad de la prueba utilizando DPS y DBS después de 48 horas y 1 semana de ser almacenadas..	37

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Función de los genes presentes en el VIH-1.....	3
<b>Tabla 2.</b> ARV's disponibles en México.....	9
<b>Tabla 3.</b> Éxito de amplificación del plasma, de DPS y DBS después de 48 horas y 1 semana de ser almacenados.....	31
<b>Tabla 4.</b> Determinación del tropismo viral por los algoritmos Geno2Pheno (modelos clínico y clonal mostrando discordancias en rosa) y PSSM.....	32
<b>Tabla 5.</b> Mutaciones presentes en las muestras amplificadas y secuenciadas.....	34
<b>Tabla 6.</b> Especificidad, sensibilidad, VPP y VPN de la prueba.....	36



## Resumen

Introducción: Maraviroc (MVC) es un inhibidor de entrada, este se une a la co-receptor CCR5 inhibiendo la replicación de cepas de VIH-1 que utilizan el co-receptor CCR5 (R5 -trópico). Como MVC no tiene ningún efecto antirretroviral en cepas que utilizan el co-receptor CXCR4 (X4 -trópico), se requiere la determinación del uso del co-receptor (prueba de tropismo viral) para excluir la presencia de virus X4 trópico y con el fin de asegurar el efecto antiviral de MVC.

La tercera región variable (V3) de la proteína de la envoltura gp120 del VIH-1 juega un papel clave en la determinación del uso del co-receptor viral y para llevar a cabo esta determinación se han desarrollado varios ensayos fenotípicos y genotípicos. El objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia del uso de manchas de sangre seca (DBS) y manchas secas de plasma (DPS) para determinar genotípicamente el tropismo viral del VIH-1 en comparación con el plasma.

Método: Con el fin de diseñar un método para la determinación genotípica del tropismo del VIH - 1 utilizando muestras de DBS y DPS se tomaron 3 muestras diferentes procedentes de 21 pacientes positivos a VIH-1, 1ml de plasma, DBS y DPS . Para el DBS vertimos 200µl de sangre completa y para el DPS 200µl de plasma separado a través de la gravedad, ambos se colocaron en papel de filtro Whatman S&S 903. Las manchas fueron almacenadas a temperatura ambiente en una bolsa con cierre hermético. Se extrajo ARN de las manchas con QIAamp Viral RNA Mini kit después de 48 horas y de una semana de la recogida de muestras. La alícuota de 1 ml de plasma se congeló - 70°C y se extrajo su ARN después de 48 horas y se utilizó como control. El ARN se amplificó por RT- PCR y PCR anidada utilizando el diseño del primers elaborado por el grupo ANRS, después fue secuenciado por la técnica de Sanger. El tropismo genotípico fue determinar utilizando el algoritmo Geno2Pheno con FPR de 10% y utilizando criterios clonales y clínicos, así como método PSSM.

Resultados: Fueron amplificadas con éxito 14 pacientes cuyas muestras presentaron una carga viral de 184,012 copias/ml (rango: 3,726-511,547 copias/ml). El modelo clonal determina 11 muestras de plasma como R5 y 3 como X4 de las 14 muestras amplificadas e interpretadas por el algoritmo de geno2pheno, por otro lado, el modelo clínico determinó 10 muestras como R5 y 4 como X4. La correlación entre el modelo clonal y la interpretación tropismo es 98,3% (60/61 muestras) y para el modelo clínico es 96,7% (59/61 muestras), utilizando los valores de plasma como referencia. Del mismo modo, el análisis realizado con el algoritmo PSSM mostró 11 muestras con R5 tropismo y 3 con X4, con una correlación de 100% (61/61). Entre los resultado de Geno2Pheno vs PSSM se presentaron discrepancias en 3 casos.

Por otra parte, las mutaciones encontradas en los diferentes tipos de manchas en comparación con la muestra estándar (plasma) nos da una concordancia de 100% en presencia de las mutaciones en 5 de las muestras y se identificaron mutaciones en plasma que no fueron detectados en las manchas, así mismo había mutaciones en las manchas que no estaban presentes en el plasma.

Los resultados muestran el 100% de especificidad y sensibilidad para las predicciones clonales y clínicos en DPS y DBS extraídos dentro de las 48 horas, mientras que estos valores disminuyeron ligeramente si las manchas se extrajeron después de una semana de ser almacenados.

Conclusiones y discusión:

- Se encontró una buena correlación entre las muestras de DBS / DPS y el plasma para la determinación del tropismo genotípico.
- No se encontraron diferencias en la sensibilidad y especificidad para la predicción tropismo entre el modelo clonal y clínica dentro de las 48 horas de la extracción.
- Hay una alta probabilidad de éxito de la amplificación si las muestras tienen valores de carga viral mayor de 3 logs.

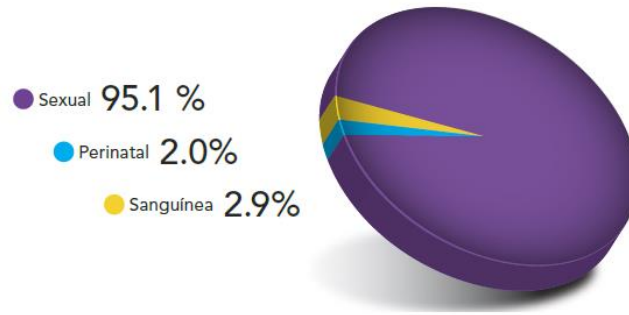
La diferencia entre los algoritmos PSSM y geno2pheno para la determinación de tropismo radica en el tipo de matriz utilizada por cada uno. PSSM sólo considera la regla 11/25, mientras que geno2pheno tiene un análisis más fuerte que incluye una comparación entre pacientes no tratados previamente con experiencia y ARV y considera que la carga viral en diferentes posiciones, además de 11/25.

## 1. Introducción

En 1981 en los Estados Unidos apareció una nueva enfermedad que fue identificada inicialmente en hombres jóvenes previamente sanos, homosexuales y que habían tenido múltiples parejas sexuales, esta se caracterizaba por que presentaban una deficiencia del sistema inmune principalmente en los linfocitos T; adicionalmente los pacientes desarrollaban infecciones inusuales tales como *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) y cáncer como el Sarcoma de Kaposi<sup>1-3</sup>. En 1983 Luc Montanier del Instituto Pasteur, Paris, identificó al agente etiológico, el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) como la causa del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)<sup>4,5</sup>. Posteriormente se observó que el VIH puede transmitirse por medio de relaciones sexuales sin protección (vaginales, anales u orales) con una persona infectada, por compartir agujas y jeringas contaminadas entre los usuarios de drogas intravenosas (UDI), por medio de transfusiones sanguíneas o hemoderivados contaminados en la población hemofílica y así mismo también puede ser transmitido de madre a hijo durante el embarazo, parto y/o lactancia<sup>6</sup>.

Para el 2012 se estimó que 35.3 millones de personas vivían con el VIH en el mundo y que habían ocurrido alrededor de 2.3 millones de nuevas infecciones por el VIH de las cuales cerca de 1.5 millones ocurrieron en África Subsahariana<sup>7</sup>. En ese mismo año en Latinoamérica habían 1.5 millones de personas infectadas por el VIH y se reportaron 86 mil nuevos casos en la región<sup>7,8</sup>. Con respecto a la distribución mundial del VIH/SIDA en los adultos (personas entre 15 y 49 años, según ONUSIDA) y en función de la tasa de la prevalencia por regiones Latinoamérica ocupa el 4to lugar con un 0.5%. De los casos presentes de VIH/SIDA en Latinoamérica en función del sexo y la edad: México (73.2%), Costa Rica (69.4%) y Panamá (68.5%) son los países con mayor porcentaje de varones adultos infectados<sup>9</sup>.

En 1983 se reportó en México el primer caso de VIH, desde esa fecha, y hasta el 30 de septiembre del 2014 existe un registro acumulado de 223 mil 995 personas que se han infectado por VIH o que han desarrollado SIDA, sin embargo solo 116 mil 936 personas se encontraban vivas, 94 mil 812 ya fallecieron y 12 mil 247 se desconoce su estatus; el 80.2% de los casos corresponden a hombres mientras que el 19.8% a mujeres, además la forma de transmisión predominante es la sexual (Figura 1) donde la vía heterosexual y homo/bisexual se encuentran igualadas en porcentaje de transmisión (34.2% y 29.4% respectivamente)<sup>9,10</sup>. Según estimaciones realizadas por ONUSIDA-CENSIDA, a finales del 2013 existían 180 mil personas viviendo con VIH (rango 140,000-230,000) donde por edades el 2.1% son menores de 15 años, 33.5% son jóvenes de entre 15-29 años, el 63.8% son adultos desde 30 años y el 0.6% se desconoce la edad<sup>10</sup>.

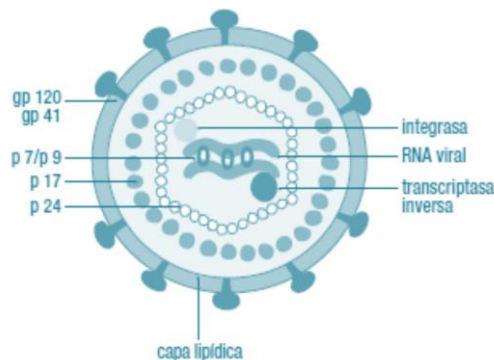


**Figura 1.** Porcentaje de las vías de transmisión del VIH-1 en México<sup>10</sup>.

Han transcurrido más de 30 años desde la aparición del VIH-1, donde la infección pasó de ser considerada fatal a una infección crónica gracias al desarrollo de la Terapia Antirretroviral Altamente Activa (TARAA) lo que ha dado origen a una reducción en la morbi-mortalidad, el incremento en la calidad y así como en la cantidad de vida<sup>11</sup>. Desafortunadamente, una gran parte de las personas que viven con el VIH/SIDA no cuentan con acceso a la terapia antirretroviral ya que se encuentran en sectores de bajos recursos o de pobreza donde el VIH continúa devastando familias, comunidades y sociedades, especialmente a las poblaciones más vulnerables<sup>12</sup>.

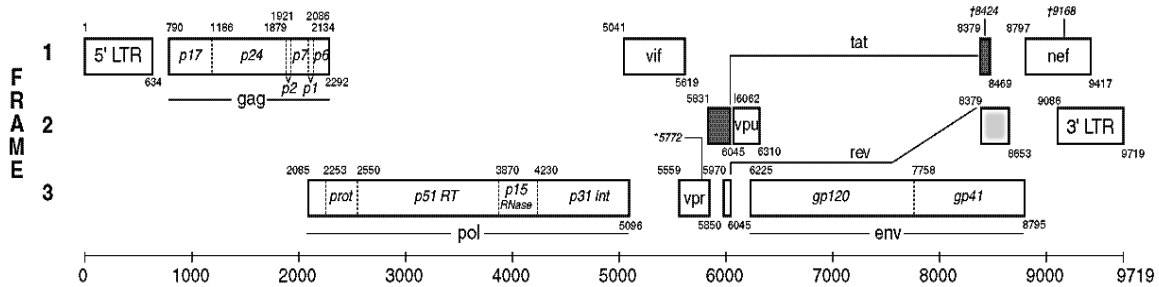
### 1.1. Características virales

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* y género de los *Lentivirus*<sup>13</sup>, este virus presenta una forma esférica de 100 nm de diámetro aproximadamente y tiene tres estructuras sobrepuestas, una envoltura viral compuesta por una doble membrana de capa lipídica tomada de la membrana celular del hospedero durante la liberación del nuevo virión, una matriz esférica y una cápside de forma cónica que contiene el genoma viral que consta de dos moléculas lineales generalmente iguales de ARN con carga positiva como se muestra en la Figura 2<sup>14, 15</sup>.



**Figura 2.** Esquema de la estructura del VIH-1<sup>16</sup>.

Esta estructura se encuentra codificada por un genoma complejo que codifica para 9 marcos de lectura; tres de éstos codifican para Gag, Pol, y Env, los cuales son subsecuentemente proteolizados en proteínas individuales comunes para todos los retrovirus del que se conocen 3 genes estructurales, 2 genes regulatorios y 4 genes accesorios y que codifican para 15 proteínas, su tamaño es de aproximadamente 9.7 kilobases (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura genómica del VIH-1 y organización de los genes estructurales (*pol*, *gag* y *env*), genes reguladores (*tat* y *rev*) y los genes accesorios (*nef*, *vpr*, *vpu* y *vif*)<sup>17</sup>.

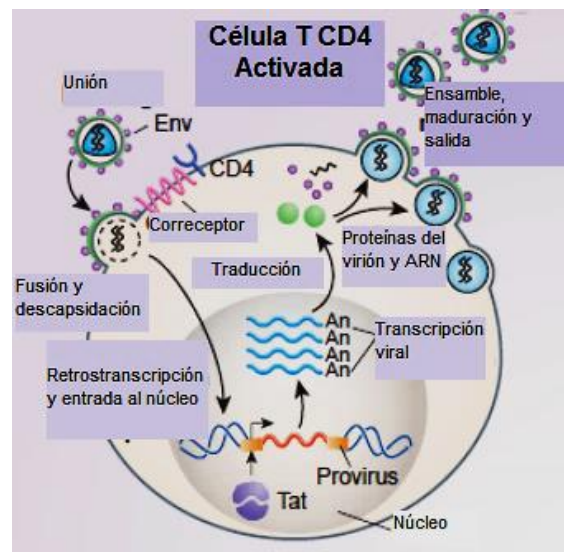
Así mismo cada gen tiene su función propia (Tabla 1).

**Tabla 1.** Función de los genes presentes en el VIH-1<sup>14-16, 18</sup>.

	Gen	Productos del Gen	Función
<b>Proteínas estructurales</b>	gag	p17/ MA	Forma la estructura de la matriz del virus
		p24/ CA	Forma la estructura de la cápside del virus
		p7/NC	Forma la estructura de la nucleocápside que contendrá el material genético del virus
	env	gp120	Media la unión con los receptores celulares CD4 y los co-receptores de quimiocinas (CCR5 y CXCR4)
		gp41	Media la fusión célula-virus
	pol	Proteasa / PR	Interviene en la formación de nuevos viriones
Transcriptasa reversa / RT		Transforma el ARN en ADN para ser integrado al genoma del huésped	
Integrasa / IN		Ayuda a la integración del ADN viral al genoma del hospedero	
<b>Proteínas regulatorias (No estructurales)</b>	tat	Tat	Activador de la transcripción mejorando la elongación de ARN pol II en la "plantilla" del ADN viral
	rev	Rev	Regulador de la expresión de genes virales
<b>Proteínas accesorias</b>	vpu	Vpu	Favorece a liberación de partículas virales
	vif	Vif	Factor de infectividad viral, evita el reconocimiento del sistema inmune
	vpr	Vpr	Facilita la infección en macrófagos
	nef	Nef	Mejora la infectividad del virión

La entrada viral constituye la fase inicial del ciclo vital del VIH, es un proceso compuesto de varias etapas durante las cuales se produce la interacción entre las proteínas virales de la envoltura del VIH y las moléculas localizadas en la superficie de la célula blanco que actúan como receptores celulares, concretamente el receptor CD4 y los co-receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4.

Muchas de las funciones virales, incluyendo la síntesis de ARN mensajeros y proteínas dependen de la maquinaria celular del hospedero, así el virus a través de la proteína gp120 (específicamente del anillo o loop V3) se une en una interacción caracterizada por una elevada afinidad al receptor CD4 que se encuentra en la superficie de la célula blanco, después se une a un correceptor secundario que es un receptor de quimiocinas CCR5 o CXCR4, una vez producida la unión virus-célula se presenta un cambio a distancia que afecta a la proteína de transmembrana gp41 en su disposición espacial, iniciando así la fusión de ambos, permitiendo la penetración del contenido viral en la célula. Finalmente se produce la descapsidación viral donde el ARN se transcribirá a una molécula de ADN y que posteriormente migrará al núcleo donde se insertará en el ADN celular del huésped (provirus); por lo tanto cada vez que la célula infectada se divide, el virus se replicará junto con el genoma de la célula hospedera y permanecerá en estado de latencia hasta que se inicie la transactivación de sus genes (Figura 4)<sup>19-21</sup>.



**Figura 4.** Ciclo de replicación del VIH-1<sup>20</sup>.

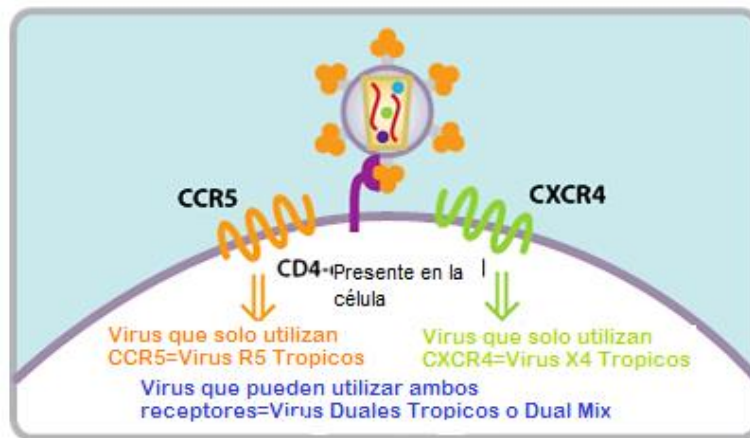
La replicación del VIH es un proceso altamente dinámico en donde un gran número de viriones son creados y destruidos por el sistema inmune diariamente, algunos estudios sugieren que la vida media de los viriones es de aproximadamente 30 minutos, y la producción de virus puede producir entre  $10^9$  y  $10^{10}$  viriones por día<sup>22</sup>.

## 1.2. Tropismo

A mediados de los 90's diversas áreas en la investigación dilucidaron sobre los roles de los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 en la eficiencia de la unión y de la entrada

del virus en las células. Las quimiocinas CCR5 y CXCR4 son los principales correceptores empleados por el VIH para entrar en las células humanas. Sobre la base del uso de los correceptores en 1998 se estableció una clasificación del virus: el tropismo CCR5 (R5), el tropismo CXCR4 (X4) y el tropismo dual (R5/X4), diez años antes Tersmette *et al* identificó una relación entre el fenotipo viral de los Inductores de Sincitios (IS) y los No Inductores de Sincitios (NIS); así como la virulencia de las cepas del VIH. Ahora sabemos gracias a los estudios in vitro, que los virus R5 suelen corresponder a NIS en las líneas de células T y que son capaces de replicarse en los monocitos-macrófagos (M-Trópico), en contraste con las cepas X4 que son IS sobre las líneas de las células T o los linfocitos y que replica el virus preferentemente en esta línea celular (T-Trópico)<sup>23, 24</sup>.

El tropismo es definido como la capacidad del VIH-1 para infectar a una célula blanco empleando un correceptor específico. El VIH requiere de dos eventos para ingresar a la célula huésped, el primero es unirse al receptor CD4 y después a un receptor de quimiocinas (CCR5 o CXCR4), el VIH puede ser caracterizado en 3 clasificaciones de acuerdo a su tropismo como lo muestra la Figura 5<sup>18, 25</sup>.



**Figura 5.** Tropismo, receptor y correceptores utilizados por el VIH-1 para entrar a la célula blanco<sup>25</sup>.

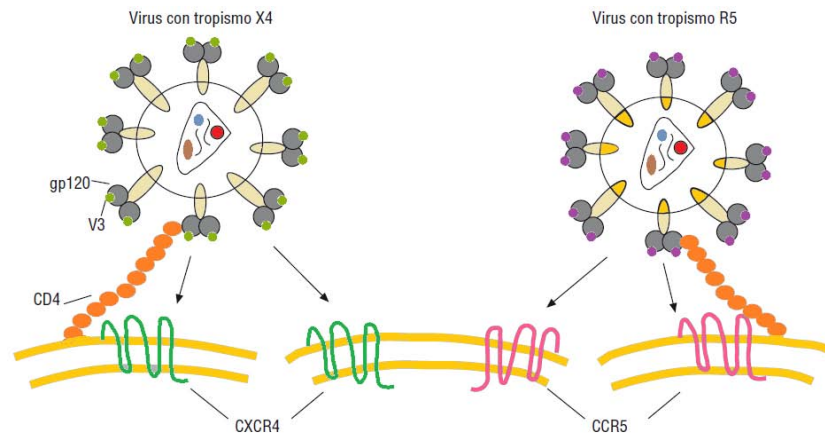
El proceso de entrada del virus en la célula inicia con la unión de la glicoproteína gp120 de la envoltura viral (que se compone de 5 regiones variables de V1 a V5, y 5 constantes de C1 a C5) al receptor CD4 y luego a los receptores celulares secundarios CCR5 o CXCR4, la unión de gp120 con el receptor CD4 se produce con alta afinidad y desencadena un cambio conformacional en gp120 exponiendo así el bucle o loop V3 que interacciona principalmente con la región del segundo bucle extracelular del correceptor (ECL2), gp120 forma una unión con sus dominios C1, C2, y C4 para que después esa unión interactúe con el N-terminal del correceptor<sup>21, 26, 27</sup>.

La doble interacción de gp120 con CD4 y con el correceptor de quimiocinas permite que el virus se ancle con una mayor estabilidad y a su vez posibilite más cambios conformacionales para exponer el N-terminal hidrofóbico de la glicoproteína transmembranal de Env, gp41, que contiene un péptido de fusión que se incorpora en la membrana de la célula huésped. El ectodominio gp41 forma una espiral extendida y una

estructura de paquetes de seis hélices que promueven la yuxtaposición de las membranas viral y la celular; esto resulta en una estructura energéticamente estable, facilitando la fusión entre las membranas viral y celular liberando así el núcleo viral dentro de la celular<sup>21, 26-29</sup>.

La secuencia de 35 aminoácidos de la región V3 determina, en gran medida, el uso preferencial del correceptor CCR5 o CXCR4 por el VIH-1 para entrar en la célula, dependiendo del correceptor utilizado los aislados del VIH-1 pueden ser clasificados como CCR5-trópicos (R5), CXCR4-trópicos (X4) o duales/mixtos (DM), el término dual/mixto engloba tanto los aislados virales que tienen verdaderamente tropismo dual (partículas virales capaces de utilizar indistintamente ambos correceptores). La doble interacción de gp120 con el receptor CD4 y con el correceptor de quimiocinas permite que el virus se ancle con una mayor estabilidad y, a su vez, posibilite un cambio conformacional que expone el dominio N-terminal hidrofóbico de gp41 a la membrana celular y permite la fusión de las membranas viral y celular (Fig. 6)<sup>21, 26-29</sup>.

Cabe señalar que los virus con tropismo R5 se presentan principalmente en las fases tempranas de la infección, sin embargo puede presentarse también las fases crónicas, del 40-50% de los individuos infectados en las etapas tardías presentaran un cambio en la preferencia del uso del correceptor del virus por el correceptor CXCR4 o ambos correceptores CCR5 y CXCR4 (R5X4), que es asociada a una rápida progresión de la enfermedad<sup>21</sup>.



**Figura 6.** Tropismo viral del VIH-1 determinado por el uso de los correceptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4<sup>16</sup>.

### 1.3. Manejo Clínico

La identificación del VIH como el agente causal del SIDA y la caracterización de su patogénesis fueron de gran importancia ya que permitió el desarrollo de los medicamentos antirretrovirales para el tratamiento de los individuos infectados con el VIH<sup>30</sup>.

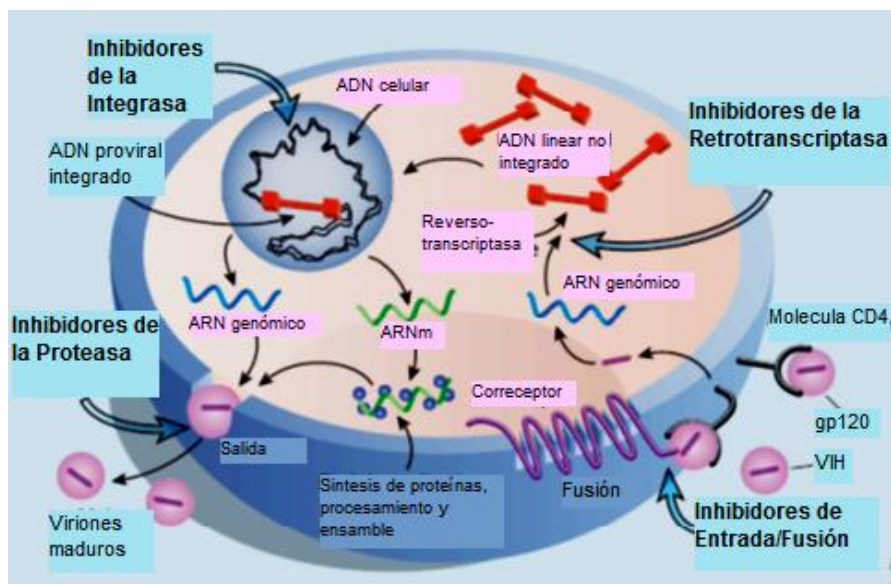
El tratamiento Antirretroviral (ARV) tienen como objetivo principal disminuir, interrumpir o inhibir la replicación del VIH dentro de las células, suprimiendo la carga viral (CV) en el plasma a niveles no detectables (inferiores a 20 ó 40 copias de ARN/ml dependiendo de la metodología empleada) el mayor tiempo posible, ayuda a restaurar y preservar la función inmune en los individuos (reconstitución inmune) mediante el aumento en el número de células CD4, manteniendo a las personas con el VIH en estado asintomático, disminuyendo la morbi-mortalidad relacionada o no al SIDA, reduciendo el riesgo de la transmisión y mejorando la calidad de vida<sup>31, 32</sup>.

La eficacia del tratamiento antirretroviral es monitoreada mediante la CV del VIH en el plasma, esta permite cuantificar el número de copias del VIH en 1 mililitro de plasma, numerosos estudios han demostrado que los valores de la CV son un buen predictor del estado de la infección, en conjunto con el conteo de las células CD4 que ayudan a predecir y monitorearla progresión de la enfermedad; así como su respuesta al tratamiento antirretroviral<sup>33</sup>.

Desde la introducción de la TARAA, el VIH ha pasado de ser considerada como una enfermedad mortal, a una enfermedad crónica y controlable<sup>34</sup>.

Los medicamentos antirretrovirales son clasificados de acuerdo a su capacidad de inhibición dentro del ciclo de vida viral: Los inhibidores de integrasa, los inhibidores de la transcriptasa reversa (nucleósidos y no nucleósidos), los inhibidores de proteasa e inhibidores de la fusión o de la entrada (gp120 y CCR5) (Figura 7)<sup>30, 35, 36</sup>.





**Figura 7.** Ciclo de replicación del VIH y objetivos de la terapia antirretroviral<sup>30</sup>.

En México la preocupación por el cuidado de los pacientes con VIH inició con el acceso a la Terapia Antirretroviral en el año de 1996<sup>11, 37</sup>, y hoy en día contamos con más de 20 medicamentos antirretrovirales aprobados para el tratamiento de la infección por el VIH (Tabla 2), sin embargo, solo unas cuantas combinaciones de ellos son las que se recomiendan actualmente para la terapia de inicio y otras más en la terapia de rescate. Para ser exitoso el régimen de tratamiento ARV debe contener 3 drogas activas, con al menos 2 mecanismos de acción diferente y cuando la supresión viral máxima no se logra o se pierde, el tratamiento debe ser modificado lo antes posible<sup>32</sup>.

Las guías internacionales de tratamiento y las guías de México recomiendan el uso de una combinación de 3 ó 4 fármacos, esta combinación tiene una base o columna vertebral de dos análogos nucleósidos y un tercer componente que puede ser un Inhibidor de la transcriptasa reversa no nucleósido o bien, un inhibidor de la proteasa (IP) potenciado con Ritonavir. Los esquemas con dos nucleósidos y un inhibidor de la integrasa o un inhibidor de entrada-CCR5 no son recomendados para el inicio de tratamiento en nuestro país debido al desconocimiento de los resultados a largo plazo y por su alto costo de los mismos; sin embargo están disponibles para su uso clínico principalmente en esquemas de rescate para pacientes con falla múltiple o altamente experimentados al tratamiento ARV<sup>32</sup>. Actualmente las guías de manejo antirretroviral de las personas con VIH en nuestro país recomiendan el uso de Maraviroc como el único inhibidor de unión del correceptor CCR5 aprobado exclusivamente para pacientes multitratados o con pocas opciones terapéuticas, y que tiene como ventaja el uso de un blanco celular más no viral, pero este sólo es útil en presencia de los virus que usan el correceptor CCR5 únicamente<sup>6, 10, 34</sup>.

**Tabla 2.** ARV's disponibles en México<sup>10</sup>.

Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos Nucleósidos (ITRAN)	Inhibidores de la Transcriptasa Reversa No Nucleósidos (ITRNN)	Inhibidores de la Proteasa (IP)	Inhibidores de Entrada (IE)	Inhibidores de la Integrasa (II)
Abacavir (ABC)	Efavirenz (EFV)	Atazanavir (ATV)	Enfuvirtida (T-20) (gp120)	Raltegravir (RAL)
Didanosina EC(ddIEC)(Cepa Enterica)	Nevirapina (NVP)	Darunavir (DRV)	Maraviroc (MVC) (CCR5)	
Didanosina (DDI)		Fosamprenavir (FPV)		
Emtricitabina (FTC)	Etravirina (ETV)	Indinavir (IDV)		
Lamivudina (3TC)		Lopinavir/Ritonavir (LPV/r)		
Estavudina (d4T)	Rilpivirina (RPV)	Saquinavir (SQV)		
Tenofovir (TDF)				
Zidovudina (ZDV)				
Abacavir/ Lamivudina (ABC/LAM)				
Abacavir/ Lamivudina/ Zidovudina (ABC/LAM/ZDV)				

En 1984 el receptor CD4 fue determinado como el receptor primario en la unión del VIH con las células CD4+, por ello se presentaron numerosos intentos de diferentes investigadores de la industria farmacéutica para desarrollar inhibidores del proceso de esta unión<sup>38</sup>.

Los correceptores CCR5 y CXCR4 fueron descubiertos unos años después por dos grupos de investigadores, estos receptores fueron la pieza faltante en la explicación de la entrada del virus en las células, y el bloqueo de esas células con sus ligandos naturales (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES para CCR5; SDF-1 para CXCR4) dando lugar a una inhibición profunda de la infección del VIH-1 in vitro debido a que CCR5 es utilizado por casi todos los aislados virales encontrados en las infecciones nuevas y que además se encuentra presente durante la mayor parte del curso de las infecciones, este correceptor presenta una vulnerabilidad potencial en el ciclo de vida del virus<sup>38, 39</sup>.

La introducción de la terapia antirretroviral provocó una reducción en la mortalidad y morbilidad asociada con el VIH, pero como es posible desarrollar resistencia a los medicamentos y además estos pueden ser tóxicos, es necesario el diseño de medicamentos con nuevos mecanismos de acción<sup>40</sup>.

En agosto del 2007 la Administración de Medicamentos y Alimentos (por sus siglas en inglés FDA o Food and Drug Administration) de Estados Unidos aprobaron el primer medicamento de una nueva clase de medicamentos que inhiben la interacción entre el receptor de quimiocina CCR5 y la glicoproteína del VIH gp120, fue aprobada para pacientes que comienzan a fallar virológicamente por que presentan resistencia a otros medicamentos antirretrovirales<sup>38 39</sup>.

Maraviroc es vendido bajo el nombre comercial Selzentry (Celcentri fuera de Estados Unidos) y está disponible en tabletas de 150mg ó 300mg, es de rápida absorción (1-4hrs), el término de la vida media después de haber ingerido una tableta de 300mg es de 14-18hrs<sup>38</sup>.

La prescripción de Maraviroc depende de su uso a previa determinación del tropismo viral lo que en muchos casos se convierte en una limitante significativa, en especial por el tiempo, facilidad y costo para la realización del mismo, así como el envío a un laboratorio de referencia<sup>41</sup>. El desarrollo de una nueva generación de pruebas para la genotipificación del tropismo de bajo costo, que posea sensibilidad, especificidad, que sea reproducible y de fácil uso puede ayudar a simplificar aún más la prescripción de Maraviroc y facilitaría la integración de la prueba de tropismo en la rutina de estudios para pacientes con VIH si lo requiere<sup>40</sup>.

#### **1.4. DPS y DBS**

La recogida de las muestras en las tarjetas de papel filtro para su transporte o almacenaje es considerada como una alternativa barata y práctica. Las muestras secas en las tarjetas de papel pueden ser de sangre total (por siglas en inglés DBS por Dried Blood Spots), plasma (por sus siglas en inglés DPS por Dried Plasma Spots) suero (por sus siglas en inglés DSS por Dried Suero Spot) o incluso de leche materna<sup>42</sup>.

Los DBS han sido utilizados ampliamente desde hace más de 40 años para realizar los estudios de tamizaje de los desórdenes metabólicos en los neonatos, aún que la técnica tiene más de 100 años, la utilidad y aceptación de esta ha tenido un impacto significativo en muchos campos de estudio como en la epidemiología, las enfermedades infecciosas, la investigación forense y la toxicología<sup>43</sup>.

Las muestras tomadas por este método pueden ser enviadas o transportados por correo o mensajería sin ser consideradas como muestras biológico-infecciosas, ya que según la Guía sobre la Reglamentación Relativa al Transporte de Sustancias Infecciosas perteneciente a la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (por sus siglas en inglés IATA) y de la Coordinación del Reglamento Sanitario Internacional de la Organización Mundial de la Salud las gotas de sangres seca, tomadas depositando una de ellas sobre un material absorbente no están sujetas a la reglamentación sobre transporte de mercancías peligrosas<sup>44</sup>. Así se han facilitado muchos estudios al simplificar aspectos como la toma de muestra, almacenamiento, transporte y la minimización de riesgo al no ser considerado como material infeccioso ya que el almacenamiento es más simple y el

traslado es más fácil aunado a que el espécimen es irrompible y no está obligado a ser congelado o colocado en hielo seco<sup>43</sup>.

Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (o PCR por sus siglas en inglés) a partir de material obtenido de los DBS, DPS han demostrado ser métodos eficaces y convenientes para un pronto diagnóstico y monitoreo de la infección por VIH en neonatos, especialmente en países en desarrollo<sup>43</sup>. Recientemente en muchas regiones de África comenzaron con el uso de DBS para monitorizar a infantes hijos de madres infectadas por el VIH, la detección de ADN del VIH-1 por PCR, ya que es una prueba altamente sensible y específica para el diagnóstico de infección en infantes así como en para la determinación de la CV y genotipificación del VIH<sup>42, 45-47</sup>.

## **2. Planteamiento del problema**

Los adelantos en la tecnología, principalmente los avances en las técnicas de biología molecular a través de la incorporación de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), sin duda ha contribuido a implementar métodos de laboratorio más sensibles de inestimable valor para el diagnóstico y manejo del tratamiento en los pacientes con infección por el VIH; sin embargo existen muchos lugares que aún no cuentan con la infraestructura, ni con el personal capacitado para llevarlo a cabo y por lo tanto es necesario acudir a laboratorios de referencia.

A medida que el acceso al tratamiento antirretroviral avanza globalmente, son necesarios esfuerzos encaminados para el monitoreo de la respuesta al tratamiento antirretroviral. El acceso al catálogo de pruebas de seguimiento (las pruebas serológicas, la carga viral, la determinación del conteo de CD4/CD8, las pruebas de resistencia mediante genotipificación y la determinación de tropismo viral) son estudios rutinarios para países industrializados o de primer mundo, así como para las grandes ciudades; sin embargo el escenario es diferente en sectores con recursos limitados, desprotegidos o en desarrollo que no cuentan con las facilidades para monitorear la infección por VIH-1, por lo tanto, es de suma importancia la implementación de métodos alternativos, confiables, de menor costo y prácticos en la obtención, almacenaje y transporte de muestras biológicas y/o sanguíneas para tener una buena monitorización, manejo y seguimiento clínico de la enfermedad siendo así el papel filtro Whatman S&S 903 una alternativa viable y de fácil uso.

## **3. Justificación**

La colecta de muestras en papel filtro Whatman S&S 903 puede ser una herramienta alternativa para los retos asociados con el almacenamiento y el transporte de las muestras a centros de referencia, adicionalmente es una forma práctica y económica para

el monitoreo y seguimiento de la respuesta al tratamiento de pacientes con infección por el VIH-1 principalmente en centros de salud con equipamiento mínimo y sin acceso a cadenas de refrigeración y además es ideal para estudios a gran escala por su bajo costo como lo han demostrado diferentes estudios.

La obtención del plasma requieren de personal capacitado como los flebotomistas, el uso de electricidad para las centrifugas y los diferentes equipos implicados, así como de sistemas de congelación para el almacenaje de muestras, cadenas de enfriamiento y un medio de transporte rápido que garantice el transporte y almacenaje adecuado para el manejo y el envío de muestras a laboratorios de referencia. El uso de DBS/DPS en lugar de sangre o plasma tiene la ventaja de emplear un menor volumen de muestra (50~200µl), además las muestras recogidas en tarjetas de papel filtro no son consideradas infecciosas y se pueden obtener los DBS/DPS con un entrenamiento relativamente corto requiriendo una manipulación mínima en el sitio de colecta. Por otro lado las manchas pueden ser colocadas en bolsas plásticas con zip-lock y almacenadas a temperatura ambiente sin requerir de un sistema de refrigeración o hielo seco por que no deben de ser envasados en recipientes herméticos ya que la falta de renovación de aire en el medio ambiente en el interior de un envase sellado provoca la acumulación de calor y humedad provocando una degradación de la muestra, por esto los especímenes pueden ser enviados en vehículos particulares, autobuses o por correo.

Actualmente han sido desarrollados diferentes estudios que han demostrado ser viables y confiables en el uso de DPS/DBS, para monitorear varios aspectos como lo es la carga viral y genotipificación a la resistencia a medicamento antirretrovirales, pero hasta el momento no ha sido aplicado para la determinación del tropismo viral del VIH-1.

Por los anterior sugerimos el uso de papel filtro Whatman S&S 903 como método de toma y almacenaje de muestra como una técnica eficaz para la conservación y amplificación del material genético del virus para la determinación del tropismo viral.

Así mismo por el éxito obtenido en los resultados de diferentes pruebas donde emplean DPS/DBS como técnica de toma de muestra esperamos que el tropismo no presente diferencias entre la comparación de los resultados tanto en las muestras plasmáticas como en los DPS y los DBS, además de que el material genético será viable aun después de 48horas/1semana de almacenaje a temperatura ambiente.

Los ensayos fenotípicos para la determinación del tropismo se basan en la generación de virus recombinante teniendo un costo elevado y que solo es realizada en centros muy especializados, sin embargo los métodos genotípicos son una buena alternativa además de ser más económico, rápido y factible para desarrollar localmente en cualquier laboratorio que cuente con tecnología para la determinación de resistencia a antirretrovirales.

El conocimiento de la secuencia de la región V3 y su asociación con los fenotipos R5 y X4 son datos que con ayuda de métodos estadísticos y algoritmos de interpretación de amplia difusión como lo son PSSM y Geno2Pheno es posible predecir de manera sencilla,

rápida y de forma gratuita el tropismo que se encuentra presente, siendo la constante evolución y actualizaciones periódicas de las bases de datos la principal ventaja del uso de estas herramientas.

#### **4. Hipótesis**

El uso del papel filtro Whatman S&S 903 como método de transporte y almacenaje de muestras, es una técnica eficaz para la conservación y amplificación del material genético del VIH para la determinación del tropismo viral el cual no presentará variaciones entre la comparación de las muestras plasmáticas con los DPS y los DBS, además el material genético será viable aun después de 48horas/1semana de almacenaje a temperatura ambiente.

#### **5. Objetivos**

##### **Principales**

- ❖ Estandarizar un método de colecta y almacenamiento de muestras de manchas secas de plasma y sangre en papel Whatman 903 (DPS/DBS) que permita conservar el material genético del virus para poder determinar el tropismo viral del VIH-1.
- ❖ Estandarizar una técnica de determinación genotípica del tropismo viral del VIH-1 a partir de muestras de manchas secas de plasma y sangre en papel Whatman 903 (DPS/DBS).

##### **Secundarios**

- ❖ Estandarización de un método para la extracción del ARN viral a partir de los DPS/DBS.
- ❖ Estandarización de la técnica de amplificación utilizando RT- PCR y PCR-Anidado para muestras con baja cantidad de material genético.
- ❖ Estandarización del método de secuenciación basada en el sistema del marcaje de Sanger.
- ❖ Comparar la sensibilidad y especificidad de la determinación del tropismo del VIH a partir de plasma vs DPS/DBS de las muestras de pacientes VIH+.
- ❖ Determinar la sensibilidad del ensayo basado en la cuantificación de la carga viral (CV).

- ❖ Determinar el tiempo de la estabilidad de las muestras en DPS/DBS con ensayos a 48 horas y 1 semana de almacenaje.
- ❖ Comparar los resultados de tropismo arrojados por el algoritmo Geno2Pheno vs PSSM.
- ❖ Identificar las diferencias en los resultados del tropismo viral a partir de plasma, DPS y DBS en cada uno de los pacientes de los que se obtuvo una muestra.

## 6. Material y método

Durante el periodo del mes de Abril del 2014 a Diciembre del 2014 se colectaron muestras sanguíneas de 21 pacientes diagnosticados con VIH.

### 6.1. Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico reciente.
- Pacientes sin experiencia a tratamiento antirretroviral o vírgenes a tratamiento.
- Pacientes con ausencia de tratamiento antirretroviral.
- Pacientes con falla a tratamiento antirretroviral.
- Pacientes con CV detectable.

La determinación de la carga viral se realizó mediante la prueba Abbott RealTime HIV-1 (rango dinámico 40–10,000,000 copias/ml). La determinación del conteo de las subpoblaciones linfocitarias de CD4/CD8 se realizó con el equipo FacsCanto II Becton Dickinson.

Para la validación de la estandarización del proceso de extracción de ARN, de la amplificación de la región V3 y secuenciación de ésta, se emplearon como controles positivos y negativos los controles del estuche de diagnóstico de resistencia genotípica para el VIH ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v2.0 Celera Corporation, ambos aprobados por la FDA de E.U.

El control positivo del VIH-1 de 8E5 es preparado diluyendo VIH tipo B (8E5) cultivado en plasma humano negativo para el ARN del VIH, este contiene un genoma defectuoso por contener una inserción de una sola base en el codón 219 siendo así no infeccioso, tiene una concentración de 50,000 a 100,000 copias/ml y está diseñado de manera que simule la muestra de pacientes en todos los aspectos dentro del procedimiento a realizar<sup>52</sup>.

El control negativo del VIH-1 de 8E5 está hecho de plasma humano normal analizado para demostrar que carece de ARN del VIH-1, este y el control positivo fue empleado en todo el procedimiento para asegurarse que no hubo contaminación dentro del procedimiento<sup>52</sup>.

## 6.2. Obtención del plasma

La sangre de cada paciente se colectó por punción de la vena del antebrazo en dos tubos plásticos sellados al vacío con anticoagulante (EDTA K3) No. Catalogo 36871. Esta sangre se utilizó también para la elaboración de DBS y DPS.

Por cada paciente uno de los dos tubos se introdujo en una centrifuga clínica durante 10 minutos a 2,000 rpm a temperatura ambiente para separar el plasma de los eritrocitos.

Con una micropipeta se tomó 1 ml de plasma teniendo el cuidado de no resuspender el paquete rojo del fondo, y se transfirió a un tubo de plástico de 1.5 ml con tapa de rosca previamente rotulado con la clave de identificación del paciente y la fecha del día de la toma de muestra, este plasma se almacenó en ultracongelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el día de su procesamiento.

## 6.3. Elaboración del DBS

Se etiquetaron las tarjeta de papel Whatman 903 por una orilla con lápiz, incluyendo la clave de paciente, la fecha de elaboración y el tipo de muestra a colocar (DBS), esta se colocó sobre una placa de cristal limpia, fácil y segura de transportar para poder realizar el muestreo.

El tubo restante de sangre total previamente colectado se mezcló cuidadosamente por inversión para homogeneizar el contenido y con una micropipeta se tomaron 200  $\mu\text{l}$  de sangre completa, esta fue vertida gota por gota sobre el papel debidamente rotulado hasta haber colocado el total del volumen. Las manchas se elaboraron por duplicado.

La tarjeta permaneció sobre la placa de cristal a temperatura ambiente durante 5 horas o hasta que las manchas se encontraran totalmente secas.

Ya secas las manchas se tomaron las tarjetas por una orilla con unas pinzas y se colocaron dentro de una bolsa plástica nueva tipo *zip-lock* (una tarjeta por bolsa) y se guardaron dentro de un sobre manila que se mantuvo en un lugar fresco y seco hasta el día de su procesamiento (48 horas y 1 semana).

## 6.4. Elaboración del DPS

Se etiquetó una tarjeta de papel Whatman 903 en una orilla con lápiz, incluyendo la clave de paciente, la fecha y el tipo de muestra a colocar (DPS), esta se colocó sobre una placa de cristal limpia, fácil y segura de transportar para poder realizar el muestreo.

El tubo en el cual fue tomada la muestra de sangre para elaborar el DBS se dejó en una gradilla durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente sobre una superficie plana para que se separara el paquete rojo del plasma por gravedad.



Ya que se separó el plasma cuidadosamente se tomaron con una micropipeta 200 µl de plasma y se depositó cuidadosamente gota por gota sobre el papel Whatman 903, esto se realizó por duplicado. La tarjeta se dejó sobre la placa de cristal a temperatura ambiente durante 5 horas o hasta que las manchas se encontraran totalmente secas.

Ya secas las manchas la tarjeta fue tomada por una orilla con unas pinzas y se colocó dentro de una bolsa plástica nueva tipo *zip-lock*. Las bolsas plásticas se introdujeron en un sobre manila que se mantuvo en un lugar fresco y seco hasta el día de su procesamiento (48 horas y 1 semana).

## **6.5. Extracción de ARN viral**

Después de 48h de almacenaje a partir del día de elaboración de los DPS/DBS se extrajo el ARN de un DPS, un DBS y de la alícuota de plasma correspondiente, así mismo se utilizó un control positivo y uno negativo para la validación de la prueba, después de una semana de almacenaje solo se extrajo el DPS y DBS restantes con un control positivo y uno negativo.

La alícuota de plasma a utilizar se sacó de ultracongelador y esperamos hasta que ésta se descongelara a temperatura ambiente.

Las manchas tanto DPS como DBS se recortaron por la orilla cuidadosamente con tijeras que fueron limpiadas con etanol al 70% entre cada mancha, ya recortadas se colocaron por separado en un tubo de plástico con tapa de rosca de 5 ml rotulado con la clave del paciente y el tipo de muestra que contiene (DPS ó DBS) y se adicionó a cada tubo 1.7 ml de Buffer de Fosfato Salino (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline DPBS) No. de Catalogo PBL01-1000ML.

Se procedió a lavar solo las manchas dejándolas en agitación durante 30 minutos en un agitador horizontal a velocidad 70 osc.pm. Concluido el tiempo de lavado se tomó 1 ml del DPBS que contiene el producto del lavado y se trasvasó a un tubo cónico con tapa de rosca de 1.5 ml identificado con la clave del paciente y el tipo de muestra.

Tanto los tubos con producto de lavado de DPS y DBS como el que contienen el plasma ya descongelado se introdujeron en una ultracentrífuga con sistema de enfriamiento a 17,000 rpm, 4°C durante 2 horas para concentrar el contenido viral de las muestras en el fondo del tubo.

Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación a alta velocidad, se retiraron las muestras de la centrifuga y fueron colocadas en una gradilla. Con una micropipeta se retiraron 860 µl del producto de lavado o de plasma, esto se realizó con especial cuidado para no resuspender el botón o pastilla del concentrado viral que se encontraba en el fondo, obteniendo al final 140 µl de concentrado.

Se mezcló el concentrado con ayuda de un vortex durante 10 segundos para poder iniciar con el proceso de la extracción del material genético con el Kit de extracción QiaAmp Viral ARN Mini Kit (250) de Qiagen siguiendo el manual de uso.

En seguida se agregaron 560 µl de buffer AVL preparado con RNA Carrier (incluido en el kit) a cada tubo y mezclamos con un vortex durante 15 segundos y se incubaron las muestras a temperatura ambiente (10-25°C) durante 10 minutos, después con una microcentrífuga dimos un spin corto a los tubos para que las gotas de muestra que se encontraban en la tapa o paredes del tubo bajaran y así evitar la contaminación cruzada por aerosoles.

Se adicionó a cada tubo con una micropipeta 560 µl de etanol absoluto grado biología molecular y se mezclaron con un vortex cada tubo por 15 segundos o hasta que la mezcla se viera homogénea, en seguida se bajaron las gotas de la muestra con un spin corto para evitar la contaminación por aerosoles.

Con ayuda de una micropipeta se tomaron 630 µl de la muestra y fue vertida dentro de una columna que se encuentra dentro de un tubo colector (incluidos en el kit) etiquetada con la clave de paciente para así introducir los tubos en una microcentrífuga durante 1 minuto a 8,000 rpm. Fueron retiradas las muestras para cambiar el tubo colector que contiene a la columna por uno nuevo (incluido en el kit). Se repitió el paso anterior hasta haber filtrado el total de la muestra en caso de ser necesario.

A cada columna se le adicionó 500 µl de buffer AW1 (incluido en el kit) y se introdujeron las muestras en la microcentrífuga durante 1 minuto a 8,000 rpm, transcurrido el tiempo se cambió el tubo colector por uno nuevo.

Después en cada columna se vertió 500 µl de buffer AW2 (incluido en el kit) para después meterlas en la microcentrífuga durante 3 minutos a 14,000rpm. Transcurrido el tiempo se cambió el tubo colector por uno nuevo y se metieron nuevamente a la microcentrífuga durante 1 minuto a 14,000 rpm.

Se retiraron las muestras de la microcentrífuga y se adicionó cuidadosamente en el centro de la columna 40 µl de agua DEPC y colocamos la columna de maneta invertida en un tubo cónico con tapa de 1.5 ml etiquetado adecuadamente con la clave del paciente, así se colocaron las muestras en la microcentrífuga durante 1 minuto a 8,000 rpm.

El producto obtenido contiene el ARN viral, con este se hicieron alícuotas de 10 µl cada una en tubos de plástico cónicos con tapa de 250 µl. Este producto se cuantificó por espectrofotometría con ayuda del equipo NanoVue para conocer la concentración de ARN obtenido en unidades nanogramos/microlitro (ng/µl), posteriormente el ARN se almacenó en un ultracongelador a -70°C hasta el momento de la elaboración de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

## 6.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para el proceso de amplificación de ARN se estandarizaron dos PCR, primero un RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa) con la finalidad de que el ARN viral se transformara a cadenas de cDNA, ya que dentro de éste se encontrará la secuencia del Loop V3, y el segundo fue un PCR-Anidado, donde el fragmento se redujo de tamaño y el número de amplicones aumento para poder tener suficiente material genético ADN para que éste fuese secuenciado.

Para la elaboración de los PCR fueron empleados los primers diseñados por el Grupo Francés ANRS AC11 Resistance Study Group dirigidos a la obtención del fragmento del genoma del VIH-1 que codifica a la envoltura viral gp120, específicamente al Loop V3<sup>53</sup>.

### 6.6.1. RT-PCR

Para elaborar este RT-PCR fue necesario tomar una de las alícuotas de ARN que se congelaron con anterioridad y mantenerlas en una cuba con hielo hasta el momento de usarlas evitando así la degradación del material genético.

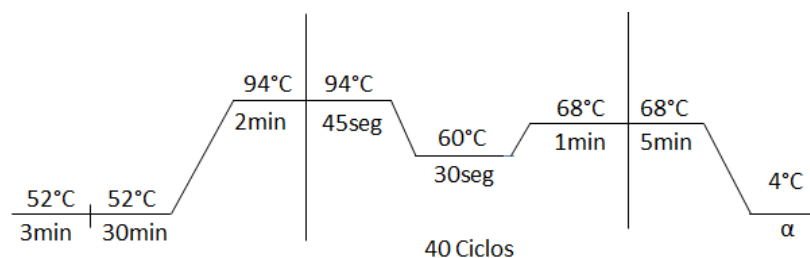
Fue empleada la enzima Súper Script III (SSIII) y los siguientes primers:

RT-PCR				
<b>Forward</b>	ENV31	5'-CAGTACAATGTACACATGG-3'	6955 a 6973	Producto final 586 pb
<b>Reverse</b>	ENV8	5'-ATGGGAGGGGCATACATTG-3'	7522 a 7540	

El Master Mix estandarizado por reacción (50 µl de volumen total de reacción) para el RT-PCR fue de:

Reactivo	Volumen
2x Reaction Mix	25 µl
Primer ENV 31 [2.5 pmol/µl]	2 µl
Primer ENV 8 [2.5 pmol/ µl]	2 µl
Agua grado biología molecular	10 µl
Enzima Super Script III	1 µl
Templete de ARN	10 µl

Los ciclos de amplificación se describen a continuación



### 6.6.2. PCR-Anidado

Para este PCR fue necesario tomar 10 µl del producto del RT-PCR que se realizó con anterioridad y tener el ADN suficiente para amplificar este en segmentos más pequeños pero sin inhibir la reacción por concentración. Cabe mencionar que no fue necesario purificar los productos del RT-PCR antes de hacer el PCR-Anidado.

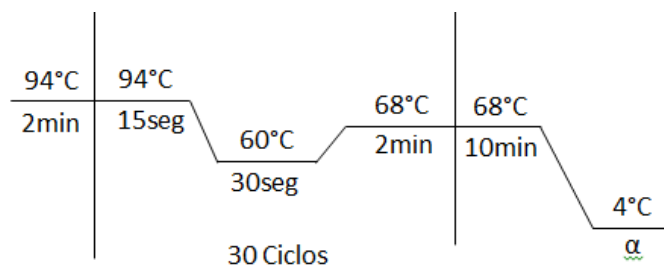
La enzima utilizada para estandarizar este PCR fue la Taq Hi Fidelity (TaqHiFi) y los siguientes primers:

PCR-Nested				
<b>Forward</b>	ENV 7	5'-AATGGCAGTCTAGCAGAAG-3'	7008 a 1026	Producto final 374 pb
<b>Reverse</b>	ED 33	5'- TTACAGTAGAAAAATCCCCTC-3	7360 a 7831	

El Master Mix estandarizado por reacción (50 µl de volumen total de reacción) para el PCR-Anidado fue:


Reactivo	Volumen
Buffer 10x	5 µl
dNTP	1 µl
MgSO <sub>4</sub>	2 µl
Primer ENV 7 [2.5 pmol/ µl]	1.3 µl
Primer ED 33 [2.5 pmol/ µl]	1.6 µl
Agua grado biología molecular	28.9 µl
Enzima TaqHiFi	0.2 µl
ADN	10 µl

Los ciclos de amplificación se describen a continuación:





### 6.6.3. Análisis de los productos de PCR

Para cuantificar los amplicones, conocer su tamaño y concentración (ng/ $\mu$ l) se cuantificó mediante el uso del Agilent 2100 Bioanalyzer en conjunto con los reactivos Agilent DNA 7500 Kit siguiendo las indicaciones del fabricante (Figura 8):

Los reactivos que se mantienen en refrigeración se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de usarlos. Ya hecho esto se colocó un chip nuevo en la estación de preparación, con una micropipeta colocamos 9  $\mu$ l de Gel-Dye Mix en el pozo  (Figura 8-A) y aseguramos a la estación la jeringa que está posicionada en la marca de 1 ml con anterioridad y en seguida cerrar la estación.

Se presionó el embolo de la jeringa hasta que esta quedó asegurada con el clip de la estación y esperamos durante 30 segundos hasta que el gel se haya esparcido por presión en el chip, transcurrido el tiempo se liberó el embolo de la jeringa y esperamos 5 segundos a que ésta regresara a su posición inicial, en caso de que no regresara el embolo a su posición original se hizo de manera manual jalando el embolo lenta y suavemente.

Se abrió la estación y se adicionó con una pipeta 9  $\mu$ l de Gel-Dye Mix en los pozos marcados con  (Figura 8-B) y posteriormente se colocaron 5  $\mu$ l de marcador de peso molecular en los 13 pozos del chip (Figura 8-C), no debe de quedar ningún pozo vacío, después se adicionó 1  $\mu$ l de DNA Ladder en el pozo marcado con  (Figura 8-D).

Finalmente en cada uno de los 12 pozos se colocaron con una micropipeta 1  $\mu$ l de productos de PCR-Anidado en el caso de que todos los pozos fueran utilizados, si no fue así a los pozos que no contenían muestra se les colocó 1  $\mu$ l de agua desionizada (Figura 8-E).



**Figura 8.** Instrucciones de la preparación del Chip Agilent DNA 7500.

El chip fue colocado de manera horizontal en un vortex con adaptador durante un minuto a 2,400 rpm y después el chip fue transferido al equipo Agilent 2100 Bioanalyzer antes de que transcurran 5 minutos para asegurar la calidad de la lectura y que el equipo pueda analizar el ADN contenido y poder conocer que muestras presentaron amplificación del fragmento deseado.

### **6.7. Purificación de productos de PCR con Columnas Millipore**

A partir de los productos de PCR-Anidado de las muestras que sí presentaron amplificación del fragmento deseado se realizó una purificación de productos de PCR para así obtener únicamente el ADN, esto lo logramos purificando el material genético con Columnas Millipore (No. de Catalogo UFC7PC250) de la siguiente manera:

Se introdujo dentro de un tubo cónico de 1.5 ml una columna que contiene una membrana millipore, y fue rotulado el tubo con la clave del paciente. Dentro de la columna con una micropipeta se vertieron 250 µl de Cloruro de Potasio (KCl) 0.2 M y posteriormente le fue adicionado todo el volumen del producto de PCR que se encontraba en el tubo de reacción de la muestra que deseamos purificar, se tapó muy bien el tubo.

Los tubos con las columnas se introdujeron en una microcentrifuga durante 15 minutos a 8,000 rpm, en seguida se sacaron los tubos y con una micropipeta fue adicionada 250 µl de agua grado biología molecular (DEPC). Se colocaron de nuevo los tubos dentro de la microcentrifuga durante 15 min a 8,000 rpm.

Finalmente en el centro de la membrana de la columna se adicionaron cuidadosamente, sin tocar con la punta la micropipeta 22 µl de agua grado biología molecular, la columna se desacoplo del tubo de plástico cónico con tapa de 1.5 ml y se traspasó de manera invertida a un nuevo tubo de plástico cónico con tapa de 1.5 ml rotulado con anterioridad de manera adecuada con la calve del paciente y la fecha, estos se introdujeron nuevamente en la microcentrifuga durante 5 minutos a 8,000 rpm, el producto obtenido

fue el ADN purificado, éste posteriormente se cuantificó con el equipo NanoVue para conocer la concentración de material genético en ng/μl de ADN.

Conociendo la concentración de ADN contenido se procedió a realizar los cálculos de dilución para proceder con a la secuenciación.

### 6.8. Marcaje con BigDye Terminator versión 3.1

Antes de comenzar se requirió conocer la concentración de ADN ya que para poder realizar la marca es necesario tener una concentración de 40 ng de ADN en 4 μl por muestra.

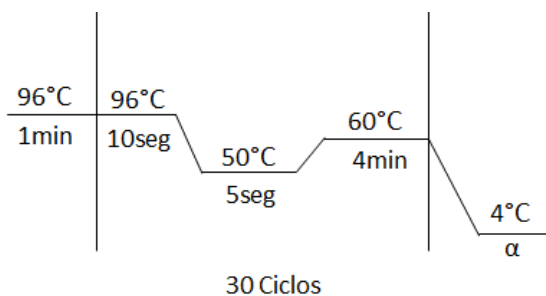
El Master Mix fue estandarizado para tener un volumen final de 10 μl, y además este se realizó por duplicado para cada muestra con los mismos primers que se utilizaron para elaborar el PCR-Anidado.

El Master Mix estandarizado para la marca es el siguiente:

Reactivo	Volumen
Big Dye	4 μl
Primer <b>ENV 7</b>	0.31 μl
Templete ADN	4 μl
Agua grado biología molecular	1.69 μl

Reactivo	Volumen
Big Dye	4 μl
Primer <b>ED 33</b>	0.41 μl
Templete ADN	4 μl
Agua grado biología molecular	1.69 μl

Condiciones de amplificación para marcaje:



## 6.9. Purificación de productos del marcaje

Para poder purificar los productos del marcaje se seleccionaron las columnas de purificación Dye Ex Qiagen 2.0 Spin Kit siguiendo las indicaciones del inserto.

Las columnas a usarse (una por reacción) se colocaron en el vortex por 5 segundos cada una para resuspender la resina que contienen, la tapa de la columna se abrió solo  $\frac{1}{4}$  de giro y se rompió el sello que se encuentra en la base de la columna, le fue acoplado un tubo colector de 2 ml (incluido en el kit) bajo de la abertura que se creó y se introdujeron las columnas con sus respectivos tubos en una microcentrífuga por 3 minutos a 3,000 rpm para compactar el contenido y eliminar burbujas.

Cuidadosamente se transfirió solo la columna a un tubo cónico de plástico con tapa de 1.5 ml nuevo rotulado adecuadamente con la clave del paciente y la fecha. Se abrió la columna retirando la tapa en su totalidad y con una micropipeta fue tomado el total del volumen de reacción del marcaje y se vertió gota por gota cuidadosamente en el centro de la cama de gel que se encuentra contenida en la columna, la punta no debe tocar las paredes de la columna y fue necesario esperar a que una gota fuese absorbida en su totalidad antes de verter la siguiente.

Se colocó la tapa a la columna dejándola abierta  $\frac{1}{4}$  de giro para que no se formara vacío dentro de la columna y estas se introdujeron a la microcentrífuga durante 3 minutos a 3,000 rpm. Transcurrido el tiempo fue retirada la columna del tubo eppendorf y el producto obtenido contenía solo el ADN marcado.

## 6.10. Secuenciación

Para secuenciar el ADN obtenido este se colocó en una placa de 96 pozos, cada muestra se pone por separado en 1 pozo. A cada pozo le fue adicionado con una micropipeta multicanal 60  $\mu$ l de etanol al 70 % y se mezcló ligeramente. La placa se tapó bien con tiras de 12 tapas y se metió en una centrífuga clínica durante 15 minutos a 3,170 rpm.

Se retiraron las tapas de la placa cuidadosamente para después esta invertirla sobre una cama de papel absorbente y así retirar el etanol contenido en los pozos, posteriormente la placa invertida se colocó sobre una nueva cama de papel absorbente y se metió en la centrífuga clínica nuevamente, se dio un "spin" fuerte para retirar el etanol restante de los pozos, después se retiró el papel húmedo y se dejó descubierta la placa en una campana de flujo laminar por aproximadamente 5 minutos para que se evaporara el residuo del etanol.

Con una micropipeta se colocó en cada pozo 10  $\mu$ l de Formamida Hi Di y se mezcló bien, terminado esto se procedió a tapar la placa con una septa y se colocó en el secuenciador 3130x/ Genetic Analyzer ABI PRISM.




Finalmente se colectaron los archivos generados por el secuenciador (los datos son arrojados en formato .ab1).

### **6.11. Análisis de secuencia (SeqScape v2.5)**

Applied Biosystems SeqScape Software v2.5 está diseñado para el análisis de secuencias, detección de subtipos de patógenos, identificación de alelos, entre otros.

Para analizar las secuencias obtenidas primero es necesario seleccionar en la opción File > New Project y después asignar un nombre al proyecto.

En la lista de plantillas de proyecto seleccionar el genoma de VIH-1 y elegir la opción de New para añadir al proyecto creado los datos obtenidos del secuenciador (formato .ab1), de inmediato seleccionar la opción New Specimen y elegir el grupo de datos a analizar.

Dar “click” en Add Samples y después en OK, para poder analizar los datos seleccionando la flecha verde  para iniciar el análisis y revisar la distribución y posición de las secuencias introducidas a través de la secuencia de referencia, esto es indicado por flechas que representan la cobertura de los primers tanto forward como reverse. Cuando fue necesario se editaron las bases con baja calidad apoyándonos en los electroferogramas.

Después de revisar las secuencias y de editarlas estas se guardaron en un archivo con formato .fasta para después introducirlas en el algoritmo Geno2Pheno.

### **6.12. Algoritmo Geno2Pheno**

El algoritmo de interpretación de más amplia difusión es Geno2Pheno[coreceptor], ya que fue desarrollado por la Universidad de Colonia y el Instituto Max-Planck, el método estadístico que utiliza para hacer sus predicciones es SVM (por sus siglas en inglés Support Vector Machine) y además es de uso libre. El algoritmo realizar las predicciones a partir de la secuencia en formato .fasta de nucleótidos o de aminoácidos de la región V3 del VIH, y la base de datos en la que basa sus predicciones consiste en un total de 1100 secuencias de la región V3 de 332 pacientes: 769 secuencias de V3 corresponden con un fenotipo R5, 210 con un fenotipo X4 y 131 secuencias con fenotipo dual R5/X4, obtenidas de la base de datos del Laboratorio Nacional de Los Álamos<sup>17, 49, 54</sup>. El servidor permite seleccionar en cada predicción el grado de sensibilidad para detectar variantes X4, seleccionando el porcentaje de FPR (False Positive Rate) en cada predicción, además presenta la posibilidad de introducir datos clínicos adicionales como la carga viral, conteo de CD4 y la presencia o ausencia de la delección de 32 pares de bases para el receptor CCR5, con el fin de mejorar las predicciones. La principal ventaja de este método es que se muestra en constante evolución y se realizan actualizaciones periódicas en las bases de datos<sup>49</sup>.

Para la interpretación de las secuencias se requirió acceder a la página <http://www.geno2pheno.org/> y seleccionar la opción geno2pheno[correceptor], en la opción "Identifier" se escribió la clave del paciente del cual se requirió identificar el tropismo. Después fue seleccionado en el rubro "Significance Levels" un False Positive Rate (FPR) o Tasa de Falso Positivo de 10 % y después fue introducida la secuencia deseada en el espacio indicado como "Sequence containing the V3 region of gp120", así mismo fueron adicionados los datos clínicos del paciente como lo son conteo de CD4/CD8 y porcentaje de CD4 así como la CV en la opción "Additional parameters". Finalmente se seleccionó el botón "Go" para que el algoritmo procediera a la determinación del tropismo.

### 6.13. Algoritmo PSSM

El algoritmo lleva por nombre PSSM por sus siglas en ingles que describe el método estadístico que utiliza "Position Specific Scoring Matrix", este fue desarrollado en la Universidad de Washington, realiza sus predicciones a partir de las secuencias de aminoácidos en formato .fasta de la región V3 analizando la composición y la posición de los aminoácidos presentes generando una puntuación relativa para determinar la probabilidad de utilizar el correceptor CXCR4 basados en la carga y en la regla 11/25<sup>54</sup>.

Las secuencias cuyos valores de carga se encuentren por debajo de -6.96 son consideradas como R5, mientras que las secuencias con valores de carga por arriba de -2.88 predicen un tropismo X4<sup>55</sup>, los valores que se encuentran intermedios son ayudados a interpretarse con la regla 11/25 que se basa en que si la secuencia presenta aminoácidos básicos, es decir cargados positivamente como la arginina (R) o la lisina (K) en las posiciones 11 y/o 25 será asociado con un fenotipo X4, la ausencia de R o K en estas posiciones se relaciona con un tropismo R5<sup>25</sup>.

Fue necesario contar con una red con internet y buscar la página <http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>. Ya en el sitio se introdujo en el campo indicado la secuencia .fasta de la muestra a determinar, en seguida fue seleccionado en el rubro "*Choose your input sequences data type*" si la secuencia se encuentra en aminoácidos o en nucleótidos y después fue elegida la opción de la matriz: Subtipo B x4r5. Finalmente se seleccionó el botón "*DoPSSM*" para obtener la determinación del tropismo.

### 6.14. Sensibilidad y especificidad

Para determinar la sensibilidad y la especificidad fue empleada una tabla de contingencia 2x2 para evaluar pruebas diagnósticas (Figura 9), esta es una distribución de datos en filas y columnas en la que los individuos de una población se clasifican en función de variables, es una de las técnicas más utilizadas para estudiar la asociación entre variables cualitativas en los estudios de epidemiología<sup>56 57</sup>.

Una prueba de diagnóstico se valida mediante la comparación de los resultados de la prueba desarrollada contra un estándar de oro, la validación de la prueba es un método de evaluación utilizado para determinar la idoneidad de una prueba para un uso particular a través de ella, se puede evaluar la efectividad de la prueba en la identificación de sujetos con y sin una enfermedad o condición, esta validación implica calcular cuatro medidas objetivas de rendimiento de la prueba, es decir, sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN), el diagnóstico de la prueba ideal debe identificar correctamente los sujetos con y sin la enfermedad o condición con 100% de precisión<sup>58</sup>.

		Estándar de oro		Total
		Positivo	Negativo	
Prueba diagnóstica	Positiva	(a)	(b)	(a+b)
	Negativa	(c)	(d)	(c+d)
	Total	(a+c)	(b+d)	(a+b+c+d)

**Figura 9.** Tabla de Contingencia 2x2 para evaluar pruebas diagnósticas<sup>56</sup>.

Se pueden conocer los atributos de la prueba mediante una tabla 2x2, en donde, en (a) se encuentran los Verdaderos Positivos (VP), en (b) los Falsos Positivos (FP), en (c) están los Falsos Negativos (FN) y en (d) los Verdaderos Negativos (VN)<sup>57</sup>.

La sensibilidad de una prueba de diagnóstico cuantifica su capacidad de identificar correctamente a los sujetos con la enfermedad o condición (VP), es decir la proporción de VP que se identifican correctamente mediante el ensayo<sup>58</sup>, dada por:

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} = \frac{a}{a + c}$$

La especificidad es la capacidad de una prueba para identificar correctamente a los sujetos sin la condición o verdaderos negativos, es la proporción de VN que son correctamente identificados por la prueba<sup>58</sup>:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{FP + VN} =$$

El Valor Predictivo Positivo de una prueba diagnóstica corresponde a la proporción de individuos con una prueba positiva para una enfermedad o condición, que están realmente enfermos o que realmente presenten la condición, dicho de otra manera, es la proporción de resultados positivos de la prueba diagnóstica en quienes la enfermedad está presente (confirmada por el estándar de oro)<sup>59</sup> y esta es calculada por:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} = \frac{a}{a + b}$$

Por otro lado, el Valor Predictivo Negativo de una prueba diagnóstica corresponde a la proporción de individuos con una prueba negativa para una determinada enfermedad o condición de interés en el estudio, que no presentan la enfermedad o evento de interés, dicho de otra manera es la proporción de personas con resultados negativos en la prueba diagnóstica en quienes la enfermedad está ausente<sup>59</sup> y esta es determinada por:

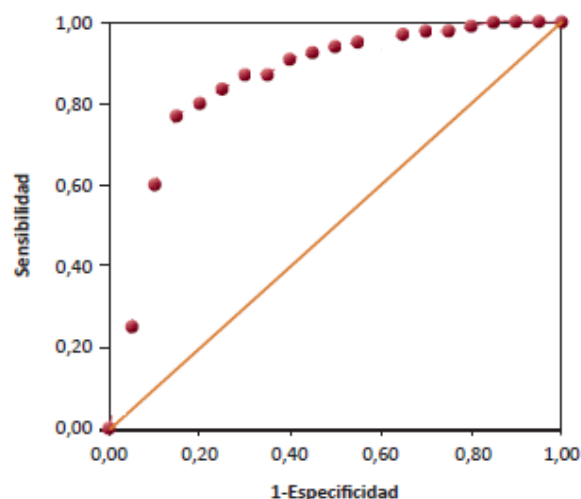
$$VPN = \frac{VN}{FN + VN} = \frac{d}{c + d}$$

## 6.15. Espacio ROC

El análisis en base a los gráficos ROC (por sus siglas en inglés *Receiver Operating Characteristics*) constituye un método estadístico para determinar la exactitud diagnóstica de tests que utilizan escalas continuas, siendo utilizadas con los propósitos específicos de determinar el punto de corte en el que se alcanza la sensibilidad y especificidad más alta; evaluar la capacidad discriminativa del test diagnóstico, es decir su capacidad de diferenciar sujetos con determinada condición versus los que no la poseen y de comparar la capacidad discriminativa de dos o más tests diagnósticos<sup>60</sup>.

Un gráfico ROC se construye con un eje Y que corresponde a la sensibilidad y el eje X que corresponde a 1-especificidad (índice de Youden), ambos ejes incluyen valores entre 0 y 1 (0% a 100%), además a modo de referencia en todo gráfico ROC se traza una línea

desde el punto 0,0 al punto 1,1 llamada diagonal de referencia o línea de no-discriminación (Figura 10), el punto que determina la sensibilidad y especificidad más alta es aquel que presenta el mayor índice de Youden, gráficamente este corresponde al punto más cercano al ángulo superior izquierdo del gráfico (punto 0,1) que representa el 100% de especificidad y sensibilidad, es decir, mientras más cercano a este lugar se encuentre el test será mejor el desempeño de la prueba<sup>60, 61</sup>.



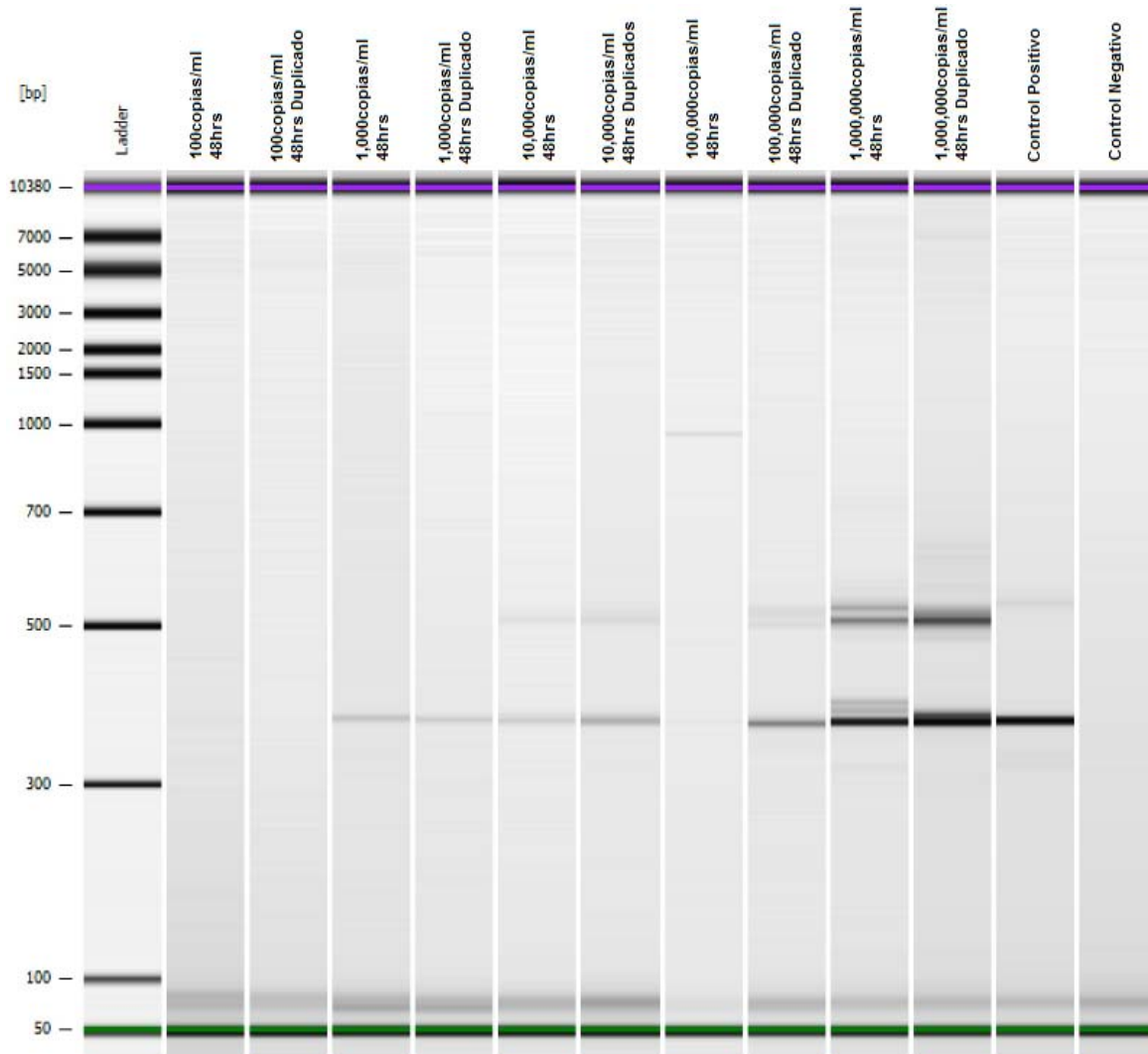
**Figura 10.** Ejemplo de un gráfico ROC de un test hipotético<sup>60</sup>.

## 7. Resultados

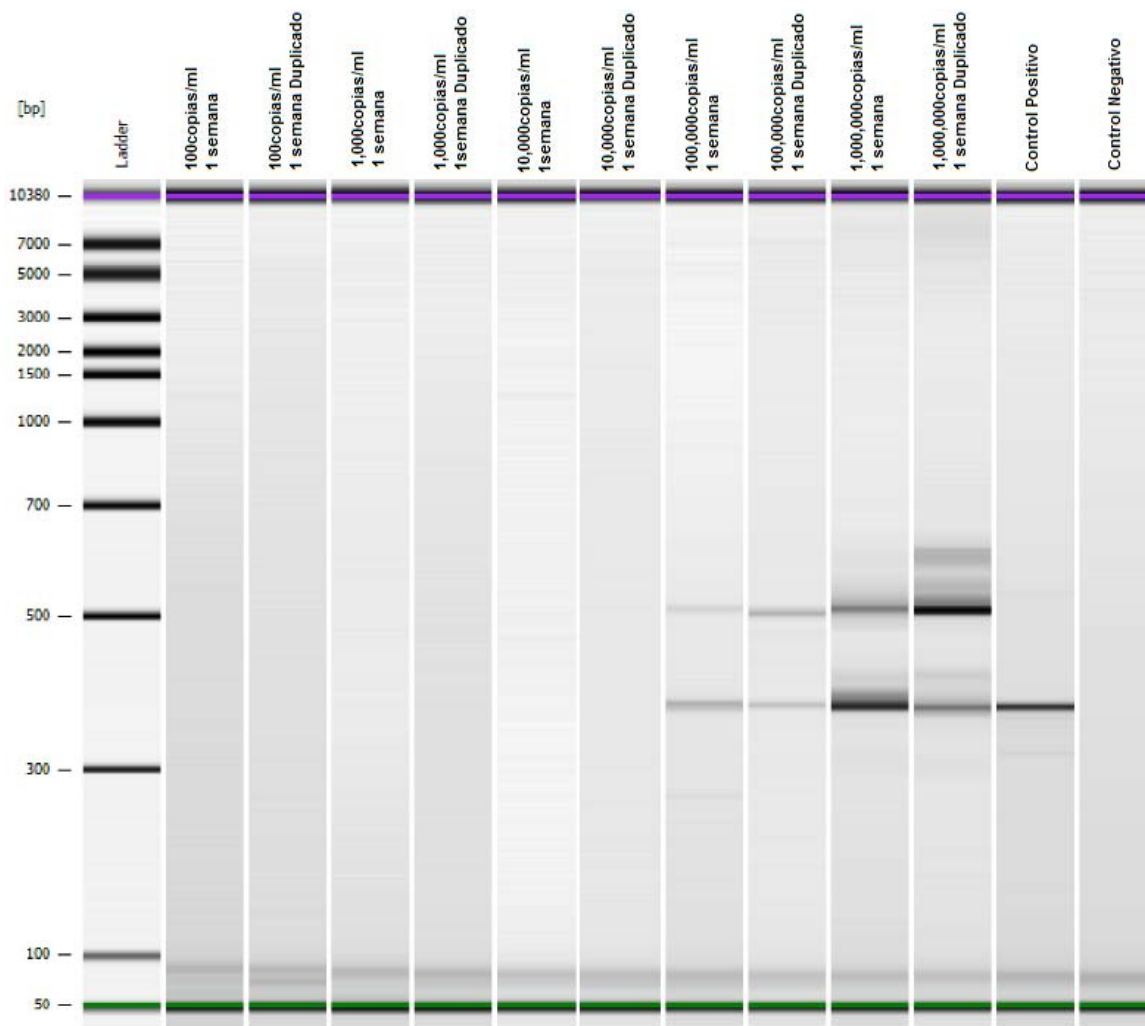
Durante el periodo del mes de Abril del 2014 a Diciembre del 2014 se colectaron las muestras sanguíneas de 21 pacientes VIH positivos, se generaron 103 muestras en total (42 DPS, 40 DBS y 21 Plasma). En una de las muestras no fue posible realizar el muestreo de los DBS debido a que solo fue proporcionado el plasma (muestra 3).

Para conocer el valor mínimo de CV que puede detectar este método, se elaboró una curva de CV en DPS utilizando como referencia inicial plasma con una CV ya determinada de 1,000,000 copias/ml. Se realizó una serie de diluciones seriadas obteniendo así cargas virales logarítmicas con respecto a la inicial ( $1 \times 10^6$  copias/ml,  $1 \times 10^5$  copias/ml,  $1 \times 10^4$  copias/ml,  $1 \times 10^3$  copias/ml y 100 copias/ml) y con éstas se elaboraron manchas por duplicado que fueron almacenadas en bolsas tipo zip-lock y posteriormente se extrajo el ARN viral después de 48 horas (Figura 11) y 1 semana de ser almacenadas (Figura 12), los productos de PCR-Anidado se amplificaron con un chip Agilent DNA 7500 conociendo así la CV mínima detectable.

**Figura 11.** Curva de la CV mínima detectada en DPS extraídos después de 48 horas de almacenados.



**Figura 12.** Curva de CV mínima detectada en DPS extraídos después de 1 semana de almacenados.



El análisis de los resultados de las diluciones seriadas mostró que a las 48 horas de ser extraído el material genético pudimos obtener una amplificación exitosa a partir de 1,000 copias/ml, en comparación con las muestras extraídas después de 1 semana donde la amplificación sólo es visible con manchas con CV mayor a 100,000 copias/ml.

De los 21 plasma recolectados se lograron amplificar 14, estos contenían una CV promedio de 184,012 copias/ml (rango 3,726-511-547 copias/ml), 2 se descartaron por su baja CV (<40 y 72 copias/ml) ya que no cumplían con los criterios de inclusión de

pacientes con ausencia de tratamiento antirretroviral y con CV detectable, y los 5 plasmas restantes no fue posible amplificarlos, estos últimos presentaban una CV promedio de 16,662 copias/ml (rango 608-65,407 copias/ml) como lo muestra la Tabla 3.

Tomando como referencia el plasma de los 14 pacientes de los cuales fue posible amplificar la banda deseada, el éxito de amplificación en los DPS con 48 horas de almacenaje fue del 92.8 % (13/14), en los DPS con 1 semana de almacenaje fue de 85.7 % (12/14), de los DBS con 48 horas de almacenaje 84.6 % (11/13) y los DBS con una semana de almacenaje 84.6 % (11/13).

**Tabla 3.** Éxito de amplificación del plasma, de DPS y DBS después de 48 horas y 1 semana de ser almacenados.

MUESTRAS AMPLIFICADAS						
N	CV (copias/ml)	PLASMA	DPS 48HRS	DPS 1 SEM	DBS 48HR	DBS 1 SEM
1	53,010	SI	NO	SI	SI	SI
2	12,572	SI	SI	SI	SI	SI
3	11,657	SI	SI	SI	NR	NR
4	511,547	SI	SI	SI	SI	SI
5	44,447	SI	SI	NO	SI	NO
6	135,606	SI	SI	SI	SI	SI
7	374,917	SI	SI	SI	SI	SI
8	44,522	SI	SI	NO	NO	NO
9	198,057	SI	SI	SI	SI	SI
10	486,874	SI	SI	SI	NO	SI
11	3,726	SI	SI	SI	SI	SI
12	363,812	SI	SI	SI	SI	SI
13	10,373	SI	SI	SI	SI	SI
14	325,046	SI	SI	SI	SI	SI
MUESTRAS NO AMPLIFICADAS						
15	72	NO	NO	NO	NO	NO
16	<40	NO	NO	NO	NO	NO
17	65,407	NO	NO	NO	NO	NO
18	608	NO	NO	NO	NO	NO
19	1,255	NO	NO	NO	NO	NO
20	10,280	NO	NO	NO	NO	NO
21	5,758	NO	NO	NO	NO	NO

NR= No Realizado

De acuerdo a las predicciones de los tropismos obtenidos por los algoritmos Geno2Pheno y PSSM correspondientes a las 61 muestras amplificadas de 14 pacientes se obtuvieron los resultados presentes en la Tabla 4.



**Tabla 4.** Determinación del tropismo viral por los algoritmos Geno2Pheno (modelos clínico y clonal mostrando discordancias en rosa) y PSSM.

N	Geno2Pheno					PSSM*
	TIPO DE MUESTRA	TROPISMO CLONAL	TROPISMO CLINICO	FPR CLONAL %	FPR CLINICO %	TROPISMO
1	PLASMA	CCR5	CCR5	81.3	80.3	0
	DPS 48HRS	NA	NA	NA	NA	NA
	DBS 48HRS	CCR5	CCR5	64.3	73.8	0
	DPS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	81.3	80.3	0
	DBS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	81.3	80.3	0
2	PLASMA	CCR5	CCR5	63.8	93.1	0
	DPS 48HRS	CCR5	CCR5	63.8	93.1	0
	DBS 48HRS	CCR5	CCR5	63.8	93.1	0
	DPS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	63.8	93.1	0
	DBS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	63.8	93.1	0
3	PLASMA	CCR5	CCR5	17.3	60.3	0
	DPS 48HRS	CCR5	CCR5	13	58.8	0
	DBS 48HRS	NR	NR	NR	NR	NR
	DPS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	16.7	61.9	0
	DBS 1 SEMANA	NR	NR	NR	NR	NR
4	PLASMA	CXCR4	CXCR4	7.8	4.2	0
	DPS 48HRS	CXCR4	CXCR4	7.8	4.2	0
	DBS 48HRS	CXCR4	CXCR4	7.8	4.2	0
	DPS 1 SEMANA	CXCR4	CXCR4	7.8	4.2	0
	DBS 1 SEMANA	CXCR4	CXCR4	8.2	4.5	0
5	PLASMA	CXCR4	CXCR4	1.7	3.1	1
	DPS 48HRS	CXCR4	CXCR4	1.7	3.4	1
	DBS 48HRS	CXCR4	CXCR4	1.7	3.4	1
	DPS 1 SEMANA	NA	NA	NA	NA	NA
	DBS 1 SEMANA	NA	NA	NA	NA	NA
6	PLASMA	CCR5	CCR5	13.2	23.4	0
	DPS 48HRS	CCR5	CCR5	20.4	24.5	0
	DBS 48HRS	CCR5	CCR5	13	23.7	0
	DPS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	13	23.7	0
	DBS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	16.6	25	0
7	PLASMA	CCR5	CCR5	13.8	16.8	0
	DPS 48HRS	CCR5	CCR5	13.8	16.8	0
	DBS 48HRS	CCR5	CCR5	13.8	16.8	0
	DPS 1 SEMANA	CCR5	CXCR4	16.6	1.4	0
	DBS 1 SEMANA	CCR5	CXCR4	12.5	7.9	0
8	PLASMA	CCR5	CCR5	20.2	28.6	0
	DPS 48HRS	CCR5	CCR5	21.1	25.8	0
	DBS 48HRS	NA	NA	NA	NA	NA
	DPS 1 SEMANA	NA	NA	NA	NA	NA
	DBS 1 SEMANA	NA	NA	NA	NA	NA
9	PLASMA	CCR5	CXCR4	11.4	4.2	0
	DPS 48HRS	CCR5	CXCR4	17.8	5.1	0
	DBS 48HRS	CCR5	CXCR4	11.4	4.2	0
	DPS 1 SEMANA	CCR5	CXCR4	17.8	5.1	0
	DBS 1 SEMANA	CXCR4	CXCR4	9.6	3.1	0
10	PLASMA	CCR5	CCR5	56.3	20.8	0
	DPS 48HRS	CCR5	CCR5	63.1	24.8	0
	DBS 48HRS	NA	NA	NA	NA	NA
	DPS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	48.7	22.8	0
	DBS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	48.7	22.8	0
11	PLASMA	CCR5	CCR5	16.4	63.1	0
	DPS 48HRS	CCR5	CCR5	23.6	60.2	0
	DBS 48HRS	CCR5	CCR5	23.6	60.2	0
	DPS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	43.2	59.9	0
	DBS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	23.6	60.2	0

N	Geno2Pheno					PSSM*
	TIPO DE MUESTRA	TROPISMO CLONAL	TROPISMO CLINICO	FPR CLONAL %	FPR CLINICO %	TROPISMO
12	PLASMA	CCR5	CCR5	33.2	72.6	0
	DPS 48HRS	CCR5	CCR5	33.2	72.6	0
	DBS 48HRS	CCR5	CCR5	33.2	72.6	0
	DPS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	33.2	72.6	0
	DBS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	33.2	72.6	0
13	PLASMA	CCR5	CCR5	47.6	52.4	0
	DPS 48HRS	CCR5	CCR5	47.6	52.4	0
	DBS 48HRS	CCR5	CCR5	19.4	27.2	0
	DPS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	25.2	26.9	0
	DBS 1 SEMANA	CCR5	CCR5	31.7	29.2	0
14	PLASMA	CXCR4	CXCR4	0.4	0	1
	DPS 48HRS	CXCR4	CXCR4	0.2	0	1
	DBS 48HRS	CXCR4	CXCR4	0.2	0	1
	DPS 1 SEMANA	CXCR4	CXCR4	0.2	0	1
	DBS 1 SEMANA	CXCR4	CXCR4	0.2	0	1

NA: No Amplificado NR: No Realizada \* La interpretación del tropismo con el algoritmo PSSM es 0=CCR5 y 1= CXCR4

El análisis con el algoritmo Geno2pheno en base al tropismo clonal determinó 11 muestras con el tropismo R5 y 3 como X4; por otro lado conforme a la interpretación del tropismo clínico se determinaron 10 muestras como R5 y 4 como X4. Para el tropismo clonal se presenta una correlación en la interpretación del tropismo del 98.3% (60/61 muestras) y para el clínico de 96.7% (59/61 muestras) teniendo en cuenta el plasma como referencia.

Fueron encontradas dos discordancias en las predicciones utilizando el algoritmo Geno2Pheno, la primera fue en la muestra 7, se determinó que tanto para el DBS como para el DPS que se extrajo después de una semana de almacenado el tropismo clínico presente es X4, y las demás muestras las determino como R5 comparación con el plasma. Con respecto a la muestra 9 se determinó que el DBS que se extrajo a la semana presentó un tropismo de X4 cuando las muestras restantes presentaban tropismo R5 en la determinación clonal, así mismo en esta muestra el tropismo clínico para las manchas y el plasma fueron determinadas como X4 a diferencia del tropismo clonal.

Una vez analizadas las muestras con el algoritmo Geno2Pheno, se procedió a realizar una segunda determinación de las muestras basada con el algoritmo PSSM, de las cuales 12 muestras fueron catalogadas como CCR5 y 2 como CXCR4, presentando diferencias en la predicción en comparación de Geno2pheno en las muestras 4, 7 y 9, en dichas muestras PSSM las identifico como CCR5 y Geno2pheno como CXCR4.

El análisis de las secuencias de aminoácidos de la región del Loop V3 de las diferentes muestras permitió identificar las presencia o la ausencia de mutaciones en los diferentes tipos de manchas en comparación con el estándar (plasma). En base a esto fue calculada su concordancia (Tabla 5), siendo así, las muestras 1, 2, 12 y 14 presentaron un concordancia del 100% mientras que las muestras restantes tuvieron una variación en la

concordancia entre el 37.5 al 97.20%. Es importante destacar que en las muestras 6, 7, 9 y 11 presentaron mutaciones en las manchas y que no estaban presentes en el plasma.

**Tabla 5.** Mutaciones presentes en las muestras amplificadas y secuenciadas.

N	TROPISMO	PLASMA	DPS 48HR	DPS 1 SEM	DBS 48HR	DBS 1SEM	CONCORDANCIA
1	CCR5	H13P T22A E25Q D29N	NA	H13H/P T22A E25Q D29N	H13P T22A E25Q D29N	H13P T22A E25Q D29N	100%
2	CCR5	T2I H13T Y21F T22A E25D	T2I H13T Y21F T22A E25D	T2I H13T Y21F T22A E25D	T2I H13T Y21F T22A E25D	T2I H13T Y21F T22A E25D	100%
3	CCR5	N5S S11G H13N Y21Y/F T22V I27I/T Q32Q/R	N5S S11G H13N X T22V I27I/T Q32Q/R	N5S S11G H13N Y21Y/F T22V X Q32Q/R	NR	NR	85.70%
4	CXCR4	I12L I14M R18K A19T F20L T22A D29D/N Q32R H34H/Y	I12L I14M R18K A19T F20L T22A D29D/N Q32R H34H/Y	I12L I14M R18K A19T F20L T22A D29D/N Q32R H34H/Y	I12L I14M R18K A19T F20L T22A D29D/N Q32R H34H/Y	I12L I14M R18K A19T F20L T22A D29D/N Q32R X	97.20%
5	CXCR4	N5G H13R Y21I T22A G24E E25R D29N C35-	N5G H13R Y21I T22A G24E E25R D29N X	NA	N5G H13R Y21I T22A G24E E25R D29N X	NA	87.50%
6	CCR5	X H13N E25- G28R Q32K H34Y	X H13N E25A X Q32K H34Y	T2T/A H13N E25A X Q32K H34Y	T2T/A H13N E25A X Q32K H34Y	T2T/A/S H13N E25A X Q32K H34Y	80%
7	CLONAL R5  CLINICO CCR5(3) CXCR4 (2)	N5G X K10R H13S/G G15A/G T22A E25D X X	N5G X K10R H13S/G G15A/G T22A E25D X X	X T2T/A/S X H13N X X E25A Q32K H34Y	N5G X K10R H13S/G G15A/G T22A E25D X X	N5G X K10R H13R G15A/G T22A E25D X X	93.30%

N	TROPISMO	PLASMA	DPS 48HR	DPS 1 SEM	DBS 48HR	DBS 1SEM	CONCORDANCIA
8	CCR5	T2I/T X S11G I12V I14M R18T A19- F20W I27V Q32K	X K10R S11G I12V I14M R18T A19- F20W I27V Q32K	NA	NA	NA	88.80%
9	CLONAL CCR5(4) CXCR5(1)  CLINICO CXCR4	T2I S11G/S I14M X R18K E25D/E I26V/I Q32K H34Y	T2I S11G/S I14M H13P/H R18K E25D/E I26V/I Q32K H34Y	T2I S11G/S I14M H13P/H R18K E25D/E I26V/I Q32K H34Y	T2I S11G/S I14M X R18K E25D/E I26V/I Q32K H34Y	T2I S11G I14M X R18K X Q32K H34Y	93.70%
10	CCR5	I14L/I R18K/R X F20L/F T22A/T E25D	X R18K/R X F20L/F T22A/T E25D	X R18K/R P16L/P F20L/F T22A/T E25D	NA	X R18K/R P16L/P F20L/F T22A/T E25D	66.60%
11	CCR5	T2K/T X E25G D29N	X X E25G D29N	X A19T/A E25E/G D29N	X X E25G D29N	X X E25G D29N	91.60%
12	CCR5	T22A T23-	T22A T23-	T22A T23-	T22A T23-	T22A T23-	100%
13	CCR5	X X H13S X X X X T22A E25D D29N X X	X X H13S X X X X T22A E25D D29N X X	N5S K10R X I14T R18K F20L Y21F T22V X X X X	X K10R H13N/S I14M X X X X E25D X Q32K H34Y	X K10R H13N I14M X X X X E25D X Q32K H34Y	37.50%
14	CXCR4	X R9I S11R I12M H13T I14M R18K A19V F20Y E25Q I27V Q32Q/R	X R9I S11R I12M H13T I14M R18K A19V F20Y E25Q I27V Q32R	X R9I S11R I12M H13T I14M R18K A19V F20Y E25Q I27V Q32R	R3K R9I S11R I12M H13T I14M R18K A19V F20Y E25Q I27V Q32Q/R	X R9I S11R I12M H13T I14M R18K A19V F20Y E25Q I27V Q32R	100%

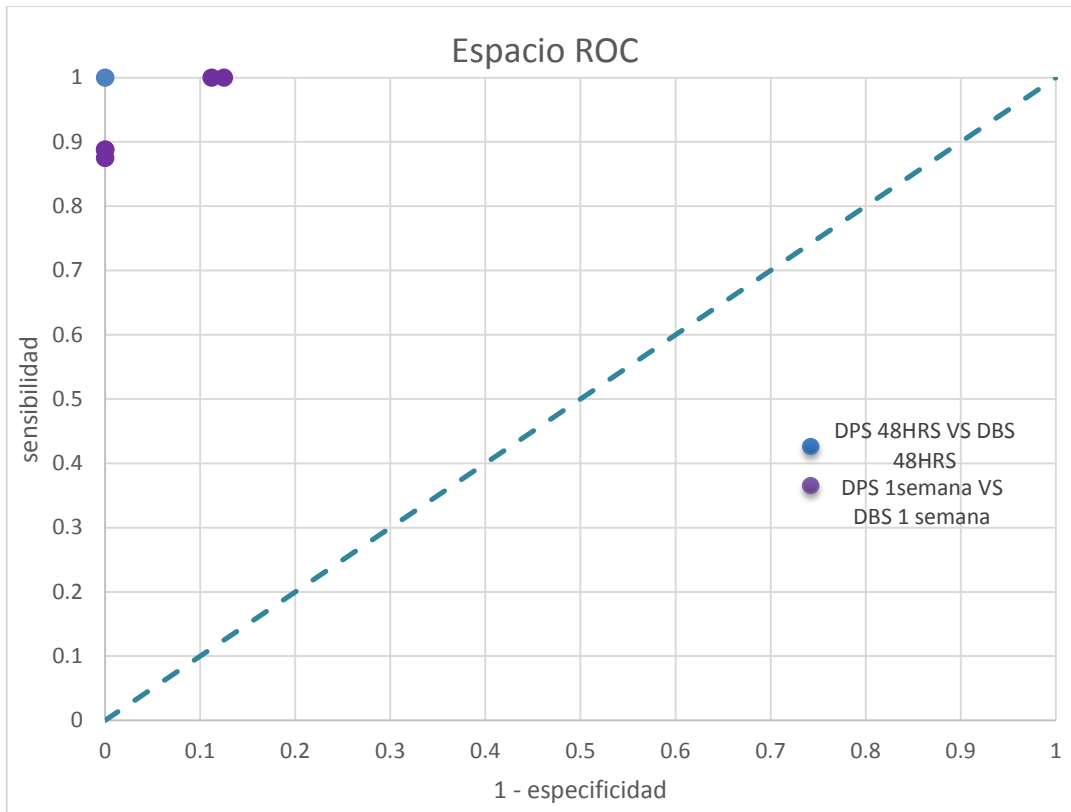
Fue valorada la sensibilidad, la especificidad, el VPP y el VPN de los resultados de los DBS y de los DPS extraídos a las 48 horas y 1 semana, en base a los tropismos obtenidos en el estándar (plasma) con el algoritmo de interpretación Geno2pheno tanto en el modelo clonal como el clínico (Tabla 6).

El resultado obtenido de la especificidad, sensibilidad, VPP y VPN en los modelos clonal y clínico en las muestras con 48 horas de almacenaje fue del 100% para ambos modelos de determinación del tropismos, a diferencia de las manchas extraídas después de una semana de almacenaje, donde varían estos valores entre 66.6-100%.

**Tabla 6.** Especificidad, sensibilidad, VPP y VPN de la prueba.

	CLONAL				CLINICO			
	48HRS				48HRS			
	DPS		DBS		DPS		DBS	
	R5	X4	R5	X4	R5	X4	R5	X4
<b>SENSIBILIDAD (%)</b>	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>ESPECIFICIDAD (%)</b>	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>VPP (%)</b>	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>VPN (%)</b>	100	100	100	100	100	100	100	100
	CLONAL				CLINICO			
	1 SEMANA				1 SEMANA			
	DPS		DBS		DPS		DBS	
	R5	X4	R5	X4	R5	X4	R5	X4
<b>SENSIBILIDAD (%)</b>	100	100	88.8	100	88.8	100	87.5	100
<b>ESPECIFICIDAD (%)</b>	100	100	100	88.8	100	88.8	100	87.5
<b>VPP (%)</b>	100	100	100	66.6	100	75	100	75
<b>VPN (%)</b>	100	100	66.6	100	75	100	75	100

El análisis en base al espacio ROC (Figura 13) muestra que la sensibilidad y especificidad en la prueba es del 100% para los DPS y DBS con 48 horas de almacenaje y es casi del 100% para los DPS y DBS con 1 semana de almacenaje.



**Figura 13.** Grafica del espacio ROC que muestra la especificidad y sensibilidad de la prueba utilizando DPS y DBS después de 48 horas y 1 semana de ser almacenadas.

## 8. Discusión

La infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida es un problema de salud pública importante<sup>5</sup>, en México en el 2012 se estimó que 220,000 personas estaban infectadas por el VIH-1, se reportaron entre 8,800-21,000 nuevas infecciones y 9,800-15,000 personas murieron de SIDA durante ese año<sup>62</sup>.

El interés por los estudios de tropismo del VIH, ha aumentado desde que se iniciaron los ensayos clínicos con los antagonistas de los receptores CCR5 y CXCR4, hasta el momento el antagonista de CCR5, MVC, que inhibe específicamente la replicación de variantes R5-trópicas, es el único fármaco de esta familia aprobado para el tratamiento y el manejo de la infección por VIH-1.

La determinación del uso del correceptor del VIH-1 ha sido objeto de diferentes estudios, en los ensayos fenotípicos, Trofile es el único Laboratorio Clínico (Clinical Laboratory Improvement Amendments/CLIA) con certificación para la determinación del tropismo, sin

embargo, su uso es limitado debido al costo, la logística del transporte y envío de las muestra; así como el acceso a laboratorios de referencia, esto ha dado pauta al desarrollo de métodos alternativos para validar las predicciones del tropismo<sup>63</sup>. El uso de DPS/DBS ha demostrado gran capacidad para su aplicación en pruebas de diagnóstico, carga viral y genotipos adicionalmente son fáciles de usar, baratos y el transporte de muestras no genera ningún riesgo<sup>47</sup>, además es importante mencionar que hasta el momento no se ha reportado un método que emplee DPS/DBS para la determinación del tropismo por lo que hace a este trabajo el primero en su tipo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio el límite de CV mínima necesaria para poder amplificar el material genético del VIH-1 con nuestro sistema de colecta de muestra es de 3 logaritmos copias/ml como lo han demostrado otros estudios enfocados a la determinación de la CV a partir de DPS<sup>48, 50, 64, 65</sup>.

En relación al tipo de muestra procesada, el éxito de amplificación fue mayor en los DPS, siendo los DPS con 48hrs de almacenaje los que obtuvieron el mejor resultado de amplificación con un 92.8% comparado con el resto de las manchas. Con respecto a las muestras que no fueron amplificadas (7) tres de ellas presentaron una carga viral inferior a 3 log que es el límite de nuestro sistema. Por otro lado 4 muestras tuvieron valores de carga viral superiores a 3 logaritmos, la primera de ellas con un valor muy cercano a nuestro límite de amplificación y las tres restantes con valores superiores a nuestro límite, sugiriendo que la falla de amplificación no fue asociada con el valor de la carga viral bajo.

La predicción del tropismo clonal y clínico en base al algoritmo Geno2Pheno determinó que 14 pacientes presentaron concordancia, a excepción de dos muestras (7 y 9). La muestra del paciente 7 presentó diferencias en el tropismo de los DPS y DBS con 1 semana de almacenaje: predicción clonal R5, contrariamente a la predicción clínica X4. El motivo de las diferencias puede deberse a que la predicción clonal está basada en los ensayos clonales y en secuencias de la región V3, mientras que la predicción del modelo clínico está fundamentada en los datos de aislados clínicos de pacientes vírgenes a tratamiento (naïve). Por otro lado el valor del FPR clonal en la muestra 7 DPS a 1 semana fue de 16.6% y para el DBS de 1 semana fue de 12.5%, así como el FPR clínico fue de 1.4% y 7.9% respectivamente, estos valores se encuentran muy cerca del porcentaje del FPR recomendado por las guías internacionales (10%), siendo así susceptible de caracterizar el tropismo en un sentido u otro, el mismo comportamiento también fue observado en la muestra 9. Cabe señalar que si la predicción del FPR fuese elevado a un valor del 20% en la predicción las discordancias no se presentarían.

Por otro lado en la comparación de predicciones entre las plataformas Geno2Pheno y PSSM se observaron discordancias en las muestras 4, 7 y 9, esto es debido a que la plataforma PSSM solo toma en cuenta los aminoácidos presentes en las posiciones 11/25 (Regla 11/25) de la secuencia del Loop V3, por otro lado Geno2Pheno considera la comparación de las secuencias, la regla 11/25, y adicionalmente las posiciones 6, 7 y 8<sup>66</sup>.

Cuando se usa la predicción clínica en el algoritmo de Geno2pheno se pueden introducir los datos clínicos de los pacientes como el conteo de CD4, CD8 y la CV mejorando la predicción obteniendo así un análisis más robusto.

Se encontró una concordancia de mayor al 90% entre el plasma y las manchas de 8 pacientes (48 horas y 1 semana) y 6 pacientes con un rango de concordancia entre 37.5 y 88.8%. Cabe mencionar que 5 mutaciones fueron detectadas en el plasma pero no estuvieron presentes en las manchas. Interesantemente 11 mutaciones fueron detectadas en las manchas pero no en el plasma.

La sensibilidad y especificidad calculada para nuestro método demostró tanto para el modelo clínico y clonal en las muestras DPS, DBS con 48 horas y DPS con una semana una sensibilidad y especificidad del 100% concordado así mismo con el gráfico de espacio ROC; cabe señalar que se observó una reducción en la sensibilidad y en la especificidad en los DBS almacenados a una semana modelo clonal, así como en los DPS/DBS de 1 semana para el modelo clínico.

De acuerdo al valor predictivo positivo y negativo, las manchas de DPS/DBS 48 horas para los modelos clonal y clínico obtuvieron un valor del 100%, así como los DPS modelo clonal a una semana. Se encontró una disminución de los valores predictivo positivo y negativo para el resto de las manchas.

## **9. Conclusiones**

Fue posible estandarizar un método de colecta y almacenamiento para manchas de sangre y plasma en papel S&S 903, el cual permitió ajustar la técnica para la determinación genotípica del tropismo Viral del VIH-1 a través de la amplificación de RT-PCR y PCR-Anidado y la secuenciación basada en marcaje de Sanger que fueron estandarizadas exitosamente ya que estas son confiables y altamente reproducibles.

De acuerdo a los datos obtenidos en este estudio, la determinación del tropismo viral del VIH-1 a partir manchas secas de plasma o sangre puede realizarse en pacientes que presenten valores de carga viral superiores a 3.0 logaritmos. Es importante señalar que las muestras procesadas dentro de las primeras 48 horas presentan mayor estabilidad en el material genético por lo cual podemos esperar que esta prueba sea altamente específica y sensible.

La determinación del tropismo mostro una buena correlación entre los resultados obtenidos a partir de las manchas DPS y DBS con respecto al plasma tomado como estándar.

Con respecto a la sensibilidad y especificidad de la predicción del tropismo entre el modelo clínico y clonal del algoritmo Geno2Pheno, tanto para manchas de sangre como para las de plasma, después de 48 horas de la extracción no se encontró diferencias siendo del 100% para ambos casos. Por otro lado los resultados muestran que la sensibilidad y la especificidad fueron más altas en DPS en comparación con los DBS.



En la comparación de las plataformas de determinación del tropismo utilizadas, Geno2Pheno nos ofrece la opción de introducir más parámetros (CV, CD4, CD8) ya que considera la presencia de ciertos aminoácidos y nos revela el FPR clonal y clínico además de que se encuentra en constante actualización, siendo así más robusto que el algoritmo PSSM que solo toma en cuenta la regla 11/25.

Las manchas de plasma o sangre son muy fiables para la determinación del tropismo viral, además las manchas de sangre no requiere carga de trabajo adicional. Por lo tanto, son una buena opción para la obtención y el envío de muestras en los países con recursos limitados.

## 10. Referencias Bibliográficas

1. Russi E, Oelz O, Vogt P, Baumann C. Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in a Previously Healthy Homosexual Man. *Infection*. 1982;11:196-197.
2. Center of Disease Control. Pneumocystis Pneumonia. Los Angeles Available: [http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june\\_5.htm](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm).
3. Center of Disease Control. Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia Among Homosexual Men — New York City and California. *Morbidity and mortality weekly report*. 1981 30:305-316.
4. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W y Montagnier L. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220:868-871.
5. Mikulas Popovic M, Sarngadha MG, Hra E y Robert C. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science*. 1984;224:497-500.
6. Secretaria de Salud Subsecretaria de Prevención y Promoción a la Salud. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica del VIH - SIDA. México D.F. 2012.
7. UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. 2013.
8. Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH/SIDA (CENSIDA). El VIH/SIDA en México 2012. Secretaría de Salud 2012.
9. Teva I, Bermúdez MP, Ramiro MT y Buela-Casal G. Situación epidemiológica actual del VIH/SIDA en Latinoamérica en la primera década del siglo XXI. Análisis de las diferencias entre países. *Rev Med Chile*. 2012;140:50-58.
10. Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH y el SIDA. La epidemia del VIH y el sida en México. In CENSIDA, (Ed). México, D. F. 2013.
11. Palmisano L y Vella S. 2011. A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. *Ann Ist Super Sanità*. 47:44-48.
12. Hoffmann C, Rockstroh JK y Rockstroh BS. *HIV Medicine*. 2007:23-24.
13. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2014 Release Available: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
14. Shehu-Xhilaga M y Oelrich R. Basic HIV virology. En: Hoy J LS, (Ed). *HIV Management in Australasia a guide for clinical*. Australia: Australasian Society for HIV Medicine Inc. 2009:9-17.

15. Úsuga X, Ruizz Y, Montoya CJ y Rugeles MT. Role of the regulatory and accessory proteins of HIV-1 in its pathogenesis. *Acta biol Colomb*. 2009;14:3-18.
16. Pascual-Hernández A y Corral-Arias JL. El Virus de la Inmunodeficiencia Humana: Inmunopatogenia. En: La infección por el VIH: Guía Práctica. Sevilla 2003:29-36.
17. Kuiken C, Foley B, Leitner T, Apetrei C, Hahn B, Mizrachi I, Mullins J, Rambaut A, Wolinsky S y Korber B. HIV Sequence Compendium 2012. Los Alamos, New Mexico 2012.
18. Duncan C y Sattentau QJ. Viral Determinants of HIV-1 Macrophage Tropism. *Viruses*. 2011;3:2255-2279.
19. Resik Aguirre S. Retrovirus. En: Microbiología y Parasitología Médica. Cuba 2001:279-292.
20. Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*. 2003;9:853-860.
21. Gorry PR y Ancuta P. Coreceptors and HIV-1 Pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2011;8:45-53.
22. Phair JP y Zolopa AR. Mechanisms of HIV-1 Drug Resistance. *PIM and Clinical Care Options*. 2006:1-40.
23. Poveda E, Briza V, Quiñones-Mateub M y Sorian V. HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. *AIDS*. 2006;20:1359-1367.
24. Chiriac CL, Fodor MA y Şincu NI. HIV tropism and its implications for antiretroviral therapy. *Rev Romana Med Lab*. 2011;19:7-15.
25. Biosciences M. Tropism Assays Available: <http://www.monogrambio.com/hiv-tests/tropism>.
26. Raymond S, Recordon-Pinson P, Saliou A, Delobel P, Nicot F, Descamps D, Marcelin AG, Flandre P, Calvez V y Masquelier B. Improved V3 genotyping with duplicate PCR amplification for determining HIV-1 tropism. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:1972-1975.
27. Lusso P. HIV and the chemokine system: 10 years later. *The EMBO Journal*. 2006;25:447-456.
28. Gutiérrez F, Rodríguez JC, García F y Poveda E. Tropismo del VIH, Técnicas disponibles y utilidad. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:45-50.
29. Dybowski JN, Heider D y Hoffmann D. Prediction of Co-Receptor Usage of HIV-1 from Genotype. *PLoS Comput Biol*. 2010;6:1-10.
30. Fauci AS. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nature Medicine*. 2003;9:839-843.

31. Organización Mundial de la Salud. Directrices unificadas sobre el uso de medicamentos antirretrovíricos para el tratamiento y la prevención de la infección por el VIH: Sinopsis de las características y recomendaciones principales. Ginebra, Suiza 2013.
32. Consejo Nacional para la Prevención y Control del Sida (CONASIDA). Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH. México 2012.
33. Erb P, Battegay M, Zimmerli W, Rickenbach M y Egger M. Effect of Antiretroviral Therapy on Viral Load, CD4 Cell Count, and Progression to Acquired Immunodeficiency Syndrome in a Community Human Immunodeficiency Virus–Infected Cohort. *Arch Intern Med.* 2000;160:1134-1140.
34. Urdaneta AM y Vivas M. Update in antiretroviral therapy: entry inhibitors. *Infectio* 2006;10:166-272.
35. Afani A y Gallardo AM. Resistencia a la terapia antiretroviral en la infección por virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Chil Infect.* 2011;28:461-469.
36. Lobritz MA, Ratcliff AN and Eric J. HIV-1 Entry, Inhibitors, and Resistance. *Viruses.* 2010;2:1105.
37. Bautista-Arredondo S, Manean A y M. Bertozzi S. Economic impact of antiretroviral therapy prescription decisions in the context of rapid scaling-up of access to treatment: lessons from Mexico. *AIDS.* 2006;20:101-109.
38. MacArthur RD y Novak MR. Maraviroc: The First of a New Class of Antiretroviral Agents. *Clin. Infect. Dis.* 2008;47:241.
39. Sax P. Maraviroc for Treatment-Naive Patients with HIV-1 Infection: Is the Glass Half Empty or Half Full?. *J. Infect. Dis.* 2010;201:799.
40. Van Der Ryst E, Heera J, Demarest J y Knirsch C. Development of maraviroc, a CCR5 antagonist for treatment of HIV, using a novel tropism assay. *Ann. NY Acad Sci.* 2015 Companion Diagnostics.
41. Censida/Secretaría de Salud. Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH. México, D. F. 2014.
42. Johannessen A. Dried blood spots in HIV monitoring: applications in resource-limited settings. *Bioanalysis.* 2010;2:1893-1908.
43. Wenkui Li y Mike S. Lee. Overview of the History and Applications of Dried Blood Samples. In Sons JW, (Ed). Dried blood spots : applications and techniques. Hoboken, New Jersey 2014:3-21.
44. International Air Transport Association (IATA). Infectious Substance Classification DGR56. Dangerous Goods Regulations. 2015:151-155.

45. De Mulder M y Holguín A. Utilidad de los dried blood spots para monitorizar la infección por virus de la inmunodeficiencia humana en los programas de salud pública de países en desarrollo. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;1-8.
46. Bertagnolio S, Soto-Ramirez L, Pilon R, Rodriguez R, Viveros M, Fuentes L, Richard Harrigan P, Mo T, Sutherland D y Sandstrom P. HIV-1 drug resistance surveillance using dried whole blood spots. *International Med Press* 2007;12:107-113.
47. Johannessen A, Trøseid M y 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.
48. Brambilla D, Jennings C, Aldrovandi G, Bremer J, Comeau AM, Cassol SA, Dickover R, Jackson JB, Pitt J, Sullivan JL, Butcher A, Grosso L, Reichelderfer P y Fiscus SA. 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.
49. García F, Álvarez M, Bernal C, Chueca N y Guillot V. Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:297-307.
50. Reigadas S, Schrive MH, Aurillac-Lavignolle V y Fleury HJ. Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood and plasma spots. *J Virol Methods*. 2009;161:177-180.
51. Van Deursen P, Oosterlaken T, Andre P, Verhoeven A, Bertens L, Trabaud MA, Ligeon V y De Jong J. Measuring human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in dried blood spot specimens using NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0. *J. Med. Virol*. 2010;47:120-1258.
52. Biosystems A. ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System Version 2 User's Manual. Foster City, CA 2011.
53. Descamps D, Calvez V, Chaix ML, Delaugerre C, Flandre P, Izopet J, Marcelin AG, Morand-Joubert L, Peytavin G, Plantier JC, Tamalet C y Yerly S. ANRS AC11 Resistance Study Group PCR and Sequencing Procedures: HIV-1. ANRS Resistance Study Group 2015:3.
54. Perez-Olmeda M y Poveda E. Métodos de determinación del tropismo viral: tests genotípicos y fenotípicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:48.
55. Vandekerckhove LP, Wensing AM, Kaiser R, Brun-Vézinet F, Clotet B, De Luca A, Dressler S, Garcia F, Geretti, Klimkait T, Korn K, Masquelier B, Perno CF, Schapiro JM, Soriano V, Sönnernborg A, Vandamme M, Verhofstede C, Walter H, Zazzi M y Boucher CA. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. 2011:394-407.
56. Álvares-Cáceres R. Estadística aplicada a las ciencias de la salud. España: Ediciones Díaz de Santos 2007.
57. Álvarez-Martínez HE y Pérez-Campos E. Utilidad clínica de la tabla 2x2. *Rev Evidenc Invest Clin*. 2009;2:22-27.

58. Bee Wong H y Hsiang Lim G. Measures of Diagnostic Accuracy: Sensitivity, Specificity, PPV and NPV. *M Diagnostic Acc.* 2011;20:316-318.
59. Manterola C. How to Interpret a Diagnosis Article. *Rev Med Clin Condes.* 2009;20:708-717.
60. Cerda J y Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica. Aspectos teórico-prácticos. *Rev Chil Infect.* 2012;29:138-141.
61. De Sousa MR y Ribeiro AL. Revision sistemática y metaanálisis de estudios de diagnóstico y pronóstico: una guía. *Arq Bras Cardiol.* 2008;92:235-245.
62. Bertagnolio S, Rodriguez-Diaz RA, Fuentes-Romero LL, Bennett DE, Viveros-Rogel M, Hart S, Pilon R, Sandstrom P y Soto-Ramirez LE. Transmitted HIV Drug Resistance Among Drug-Naive Subjects Recently Infected With HIV in Mexico City: A World Health Organization Survey to Classify Resistance and to Field Test Two Alternative Patient Enrollment Methods. *Clin. Infect. Dis.* 2012;54:328-333.
63. Bastos-Cabral G, De Paula Ferreira JL, Osorio Coelho L, Fonsi M, Lotufo Estevam D, Souza Cavalcanti J y De Macedo Brigido LF. Concordance of HIV Type 1 Tropism Phenotype to Predictions Using Web-Based Analysis of V3 Sequences: Composite Algorithms May Be Needed to Properly Assess Viral Tropism. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2012;28:734-738.
64. Puren A, Gerlach JL, Weigl BH, Kelso DM y Domingo G. Laboratory Operations, Specimen Processing, and Handling for Viral Load Testing and Surveillance. *J. Infect. Dis.* 2010;201:27-36.
65. Bertagnolio S, Parkin N, Jordan M, Brooks J y Garcia-Lerma G. Dried Blood Spots for HIV drug resistance and Viral Load testing: a review of current knowledge and WHO efforts for Global HIV Drug Resistance surveillance. *AIDS Rev.* 2010;12:195-208.
66. Rosen O, Sharon M, Quadt-Akabayob y Anglister J. Molecular switch for alternative conformations of the HIV1 V3 region: Implications for phenotype conversion. *PNAS.* 2006;103:13950-13055.