

Implementación y utilidad de la pirosecuenciación en las poblaciones virales de pacientes con VIH-1 en Ecuador

Implementation and usefulness of pyrosequencing in viral populations of patients with HIV-1 in Ecuador

Manuel Gonzalez-Gonzalez,^I Katherine Hermida-Álava,^{II} Consuelo Correa-Sierra,^{II} Luis Fernando Gómez-Andrade,^{III} Ana Machado Diaz,^{II} Martha Castillo-Segovia,^{II} Lissette Pérez-Sánchez,^{IV} Vivian Kourí-Cardella^{IV}

^I Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Guayaquil. Ecuador.

^{II} Dirección de Investigación, Desarrollo e Innovación. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. Ecuador.

^{III} Centro Nacional de Referencia de Retrovirus, Hepatitis y otros Virus de Transmisión Sexual. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. Ecuador.

^{IV} Laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual. Departamento de Virología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Objetivo: implementar el sistema de pirosecuenciación 454 de Roche para el gen pol del VIH-1.

Métodos: a partir de muestras de plasma de 33 pacientes ecuatorianos seropositivos a VIH-1 con fallo a la terapia antiretroviral, se realizó pirosecuenciación y los resultados fueron analizados con el programa DeepChek.

Resultados: se obtuvieron resultados en 27 de las 33 muestras analizadas. Se encontraron 25 mutaciones asociadas a resistencia en poblaciones virales, siendo F77L, M184V/I, K103N/S, M46L/I, I50V/L, Q58E, V82T/F/A/S/L y L90M las más frecuentes. Se encontró una elevada resistencia a inhibidores de la reverso-transcriptasa no análogos de nucleósidos y a inhibidores de proteasa (43,5 y 44,4 % respectivamente, en poblaciones minoritarias), así como para los inhibidores de proteasa en poblaciones mayoritarias (26,4 %). Se detectaron 2, 2 y 1 muestra con resistencia completa a cada clase de medicamentos (inhibidores de la reverso-transcriptasa análogos de nucleósidos, no análogos de nucleósidos e inhibidores de proteasa, respectivamente) en poblaciones mayoritarias y 3, 4 y 6 en poblaciones minoritarias, así como 2 virus con resistencias a los tres grupos de

drogas en poblaciones minoritarias. La mayoría de las muestras fueron del subtipo B (77,8 %) en cada una de las regiones estudiadas.

Conclusiones: Este estudio permitió la implementación de la pirosecuenciación, lo cual facilitó a su vez analizar los primeros datos de resistencia a los antirretrovirales en Ecuador.

Palabras clave: Ecuador; VIH; resistencia a los antirretrovirales; mutaciones; subtipos; pirosecuenciación.

ABSTRACT

Objective: implement the pyrosequencing system Roche/454 for the gene pol of HIV-1.

Methods: based on plasma samples from 33 Ecuadorian HIV-1 positive patients with antiretroviral therapy failure, pyrosequencing was conducted and the results were analyzed with the DeepCheck software.

Results: results were obtained for 27 of the 33 samples analyzed. Twenty-five mutations were found to be associated to resistance in viral populations. The most common were F77L, M184V/I, K103N/S, M46L/I, I50V/L, Q58E, V82T/F/A/S/L and L90M. High resistance was observed to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and to protease inhibitors (43.5 and 44.4 %, respectively, in minority populations), as well as to protease inhibitors in majority populations (26.4 %). 2, 2 and 1 samples were detected with full resistance to each drug type (nucleoside reverse transcriptase inhibitors, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors, respectively) in majority populations, and 3, 4 and 6 in minority populations, as well as 2 viruses with resistance to the three drug groups in minority populations. Most samples belonged to subtype B (77.8 %) in each of the study regions.

Conclusions: the study allowed implementation of the pyrosequencing system, which made it possible to analyze the first data on resistance to antiretrovirals in Ecuador.

Keywords: Ecuador; HIV; resistance to antiretrovirals; mutations; subtypes.

INTRODUCCIÓN

Existen varios factores que pueden producir un impacto negativo en el éxito del tratamiento antirretroviral en pacientes con VIH/sida. El desarrollo de cepas virales resistentes es una de las principales razones del fracaso de la terapia antirretroviral (ARV),¹ debido a que si se acumulan mutaciones de resistencia a muchas clases de fármacos se limita el número de alternativas de regímenes terapéuticos y el éxito virológico de terapias siguientes.

El ensayo genotípico es la técnica más empleada para determinar la resistencia ARV, requiere menos tiempo para su realización, es menos compleja técnicamente, tiene un menor costo económico y presenta la ventaja adicional de que las mutaciones que se detectan pueden preceder a las resistencias

fenotípicas.² Los genes (o fragmentos de estos) que se utilizan para detectar resistencia a los ARV son aquellos que codifican las enzimas que son el blanco de esta terapia, siendo los más utilizados la reverso-transcriptasa y la proteasa. El ensayo fenotípico es la otra técnica empleada para la determinación de la resistencia ARV.

En Ecuador, existen alrededor de 29 000 personas viviendo con VIH.³ En estos momentos cuenta con un arsenal de 15 fármacos ARV. Las drogas de primera línea recomendadas por el programa de VIH/sida en el país son dos inhibidores de la reverso transcriptasa análogo nucleósido (NRTI) y un inhibidor de la reverso transcriptasa no análogo nucleósido (NNRTI), el esquema más utilizado es Tenofovir (TDF) /Emtricitabina (FTC) / efavirenz (EFV).⁴ Según reportes del Ministerio de Salud, existen 9 043 pacientes con tratamiento ARV.⁵

Las guías internacionales actuales de tratamiento ARV incluyen el empleo de las pruebas de resistencia con el fin de guiar a los médicos en la toma adecuada de decisiones con respecto a los regímenes de tratamiento en cada caso;⁶ estas pruebas desafortunadamente no están disponibles de forma estable en el país. Además se ha trazado un plan estratégico a nivel mundial con el fin de promover la implementación de la vigilancia de la farmacorresistencia ARV en cada país en pacientes bajo terapia ARV, así como para vigilar la resistencia transmitida.⁷

Por ello nos trazamos el objetivo de implementar el sistema de pirosecuenciación 454 de ROCHE para el gen pol del VIH-1, y determinar las mutaciones que confieren resistencia a las drogas ARV presentes en la poblaciones virales así como los niveles de resistencia y las variantes genéticas del VIH-1, en la muestra analizada de pacientes ecuatorianos que presentan fallo a la terapia.

MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, de corte transversal. El universo de estudio estuvo constituido por todas las muestras de plasma de los pacientes con VIH-1 recibidas, junto a su respectiva ficha de datos epidemiológicos en el Laboratorio de Virología del INSPI, Guayaquil, como parte del diagnóstico del Programa Nacional de Control y Prevención del VIH/sida. El periodo de estudio abarcó desde mayo 2013 a febrero 2014. La muestra quedó comprendida por 33 plasmas de pacientes que cumplieron los criterios de inclusión.

Los criterios de inclusión fueron: muestras de plasma que tuvieran 1 mL, que hubieran estado conservadas a -80 °C y cuya carga viral previa fuese mayor que 20 000 cop/mL (cantidad mínima requerida por la versión utilizada de pirosecuenciación 454).

Las muestras de plasma provenían de las clínicas del sida de las provincias de Pichincha, Guayas, Esmeraldas, Los Ríos y El Oro, y correspondían a pacientes con fallo a la terapia y que se mantenían con tratamiento antirretroviral.

El presente estudio forma parte de los resultados del proyecto INSPI - ESPOL "Epidemiología Molecular del VIH-1 en el Ecuador", auspiciado por SENESCYT. Dicho proyecto cuenta con la aprobación de la Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud (Comité de Ética) del Ministerio de Salud Pública ecuatoriano, además con la aprobación del Comité Científico institucional del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública de Ecuador.

EXPERIMENTOS REALIZADOS

Para la implementación del sistema de pirosecuenciación 454 para el gen pol del VIH-1 se utilizó la metodología que se describe brevemente a continuación.

La extracción del ARN del VIH se realizó con el estuche High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume (Roche, Estados Unidos de América o EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Luego se procedió a la síntesis de ADN complementario y la generación de amplicones utilizando el estuche HIV Primer Set YELLOW, (Roche, Alemania). Posteriormente, se realizó un control migrando los amplicones en un gel de agarosa al 2 %.⁸

Los productos de PCR se purificaron utilizando el estuche AxyPrep™ Mag PCR Clean-Up (Beckman Coulter, EUA) y se cuantificaron empleando el sistema QuantiT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Eugene, EUA).⁸ Con el ADN complementario amplificado, purificado y cuantificado, se realizó un PCR en emulsión con el reactivo GS Junior emPCR Reagents (Lib-A) (Roche, Alemania). Los productos de PCR obtenidos en este punto se encuentran unidos a perlas, que forman parte de los reactivos del PCR en emulsión, que posteriormente fueron recuperadas (GS Junior Titanium emPCR Kit Bead Recovery Reagents, Roche, EUA) y enriquecidas (GS Junior Titanium emPCR Kit Oil and Breaking Kit, Roche, Alemania).⁸ Las perlas se cuantificaron, siendo óptima la cuantificación de 500 000 a 2 000 000 de perlas.⁸

Posteriormente, se procedió a la secuenciación, utilizando los reactivos GS Junior Titanium Sequencing Reagents and Enzymes, GS Junior Sequencing Buffer y GS Junior Packing Beads antes de ingresar al secuenciador.⁸ Las secuencias resultantes fueron editadas automáticamente por el software Deep Chek 1.3 (Advanced Biological Laboratories). Las técnicas se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche).^{9,10}

ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA

Para la clasificación de la resistencia se siguió el algoritmo de Stanford, versión 6.2.0 (<http://hivdb.stanford.edu/pages/documentPage/drm.html>) y para el análisis de las mutaciones se siguió el listado de la IAS 2014.¹¹

Los niveles de resistencia definidos por el Deep Chek-HIV algorithms v10.3 para la base de datos de Stanford (v7.0- 27/2/2014) fueron: categoría susceptible (S), resistencia intermedia (RI) y resistencia alta (RA). Los niveles de resistencia a los tres grupos de medicamentos se calcularon mediante la determinación del promedio del porcentaje de RA, RI y RB de cada medicamento individual que pertenece a cada clase de fármaco. Se consideró que las muestras de los pacientes tenían resistencia cuando presentaron RI o RA.

Se clasificó como resistencia total a una clase (FCR) cuando no existía ninguna droga sensible a la clase en cuestión.¹² La resistencia a múltiples fármacos (MDR) se definió como las muestras resistentes a todos los medicamentos de las tres clases, pudiendo encontrarse una excepción de un solo medicamento de una clase.¹²

Tabla 1. Características generales de los pacientes estudiados. Ecuador, mayo 2013-febrero 2014

Código	CV (copias/mL) ^a	Niveles de CD4+/mm ³ _a	Edad (años)	Sexo	Preferencia sexual	Tiempo de inicio de terapia (meses)	Número de terapias	Primera combinación	Segunda combinación	Tercera combinación
1	265663	88	48	M	BS	41	3	TDF+FTC+EFV	3TC+ABC+LPV	AZT+3TC+RAL
2	75082	47	12	F	HT	76	1	AZT+3TC+EFV		
3	98023	37	42	F	HT	21	3	AZT+3TC+LPV/R	AZT+3TC+EFV	TDF+FTC+RAL
4	20623	37	29	M	ND	ND	2	AZT+3TC+EFV	TDF+FTC+RAL	
5	158015	46	15	M	NA	ND	3	AZT+3TC+RTV	AZT+3TC+EFV	ABC+ddI+LPV/R
6	147426	61	23	F	ND	ND	2	3TC+ddI+EFV	TDF+FTC+LPV/r	
7	46513	95	27	M	ND	ND	3	DDI+3TC+LPV/R	TDF+FTC+EFV	TDF+FTC+LPV/r
8	61947	729	34	M	ND	ND	2	D4T+3TC+EFV	ABC+EFV	
9	115421	149	26	F	HT	40	2	AZT+3TC+EFV	FTC+TDF+EFV	
10	168677	ND	51	M	ND	39	ND	ND		
11	38038	ND	46	F	HT	ND	ND	ND		
12	116741	ND	39	M	ND	102	ND	ND		
13	165677	ND	53	F	ND	55	ND	ND		
14	81928	ND	31	F	ND	117	ND	ND		
15	937839	98	45	F	ND	45	2	3TC+ABC+EFV	TDF+FTC+LPV/r	
16	1580860	260	27	M	ND	32	2	AZT+3TC+EFV	TDF+FTC+EFV	
17	46013	203	47	M	ND	105	3	ABC+3TC+EFV	TDF+FTC+EFV	TDF+FTC+LPV/r
18	331154	21	11	M	NA	77	2	AZT+3TC+NFV	AZT+3TC+EFV	
19	70569	493	4	M	NA	8	3	AZT+3TC+NFV	AZT+3TC+LPV/r	TDF+EFV+DRV/r
20	85532	583	11	F	NA	56	1	AZT+3TC+EFV		
21	104030	459	2	F	NA	7	2	AZT+3TC+LPV/r	ABC+ddI+LPV/r	
22	322931	519	3	F	NA	ND	2	3TC+LPV/r	EFV+ETC	
23	67938	409	2	M	NA	ND	3	AZT+3TC+EFV	AZT+3TC+NFV	AZT+3TC+LPV/r
24	938414	823	10	M	NA	ND	2	AZT+3TC+NFV	AZT+3TC+LPV/r	
25	68444	1128	1	M	NA	ND	1	ABC+3TC+LPV/r		
26	30386	1238	5	M	NA	ND	2	AZT+3TC+NFV	AZT+ETC+EFV	
27	400001	433	11	F	NA	ND	1	AZT+3TC+EFV		

^a: último valor recogido de la ficha de datos; CV: carga viral; M: masculino; F: femenino; BS: bisexual; HT: heterosexual; ND: no disponible; NA: no aplica; ABC: Abacavir; AZT: zidovudina; DRV: darunavir; D4T: estavudina; ddI: didanosina; EFV: efavirenz; FTC: Emtricitabina; LPV: lopinavir; NFV: nelfinavir; RAL: raltegravir; TDF: Tenofovir; 3TC: lamivudina; /r: potenciado con ritonavir.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinaron las frecuencias absolutas y relativas de las variables estudiadas, mediante una base de datos en Excel. Las variables incluyeron las mutaciones que confieren resistencia a los ARV presentes tanto en poblaciones minoritarias, como en las poblaciones mayoritarias y en el total.

Se recogieron datos de la ficha de resistencia del Programa Nacional de VIH/sida. Los datos recogidos con su número de identificación, abarcaron las siguientes variables de estudio: edad (años), sexo, preferencia sexual (heterosexual, homosexual o bisexual), terapia antirretroviral (medicamentos, número de terapias), valor de la última carga viral (CV; dividida en 2×10^4 - 10^5 , 10^5 - 10^6 , $>10^6$ copias/mL) y valor de los linfocitos T CD4+ (divididos en <200 , 200-350, 350-500, >500 células).

En la [tabla 1](#) se exponen los datos de las fichas epidemiológicas.

Se realizó una regresión logística para buscar la posible asociación entre los subtipos y las mutaciones encontradas. Las variables cuantitativas continuas (edad, carga viral y niveles de células CD4) fueron analizadas también mediante la mediana, considerando los valores mínimo y máximo (edad), así como el 1er. y 3er. cuartil (IQ1 e IQ3, de CV y niveles de células CD4+).

RESULTADOS

La mediana de la edad fue de 26 años, predominó el sexo masculino (51,9 %), siendo los heterosexuales (HT) los más representados con el 25,9 %.

La mediana del recuento de células T CD4+ más cercana al momento de la toma de muestra fue de 446 células/mm³ (1er. cuartil 189,5 y 3er. cuartil 619,5) y la de la carga viral de 104 030 copias de ARN/mL (1er. cuartil 67 938 y 3er. cuartil 322 931).

En la muestra estudiada se encontraron 12 niños, los que habían sido tratados con 13 esquemas terapéuticos ARV. En los niños la mediana del recuento de células T CD4+ más cercana al momento de la toma de muestra fue de 476 células/mm³ y la de la carga viral de 94 781 copias de ARN/mL.

ANÁLISIS DE MUTACIONES QUE CONFIEREN RESISTENCIA ANTIRRETROVIRAL EN LOS GENES DE LA REVERSO TRANSCRIPTASA Y DE LA PROTEASA VIRAL

Se obtuvieron resultados en 27 de las 33 muestras de plasma estudiadas. Las secuencias obtenidas pertenecen al gen pol, de la región que codifica para la proteasa (PR) y la reverso-transcriptasa o transcriptasa inversa (TI) del VIH-1 y que comprende 89 aa que codifican para la proteasa y 250 aa que codifican para la TI.

Se encontraron un total de 25 mutaciones que confieren resistencia a alguna de las familias de los antirretrovirales estudiadas; de estas 16 mutaciones en el gen de la TI confieren resistencia a los ARV, 10 de ellas a uno o varios de los medicamentos de la familia de los NRTI y 6 a uno o varios de los medicamentos

de la familia de los NNRTI. Además se detectaron 9 mutaciones mayores, que confieren resistencia a uno o varios de los medicamentos de la familia de los inhibidores de proteasa (PI) (Fig. 1).

Las mutaciones más frecuentes encontradas en la región de la TI que confieren resistencia a los NRTI y los NNRTI, fueron: F77L, M184V/I y K103N/S (Fig. 1). Se encontró una mayor frecuencia de mutaciones primarias asociadas a resistencia en la región de la PR; entre las más prevalentes estuvieron: M46L/I, I50V/L, Q58E, V82T/F/A/S/L y L90M.

En poblaciones virales minoritarias y mayoritarias se detectaron diferencias en las frecuencias en cuanto a la presencia de cada una de las mutaciones que confieren resistencia. Por ejemplo, en la región de la TI en poblaciones minoritarias se encontró la F77L y la K101E/P a diferencia de las poblaciones virales mayoritarias (en ambas poblaciones se encontró la M184V/I y la K103N/S). Se hallaron mutaciones menos frecuentes pero de gran importancia como la M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y y la K219Q/E en la región de la TI en poblaciones virales mayoritarias.

En la región de la PR, las mutaciones más frecuentes en poblaciones minoritarias fueron la M46L/I, I50V/L, Q58E y V82T/F/A/S/L, mientras que en las poblaciones mayoritarias fue la L90M.

La frecuencia de mutaciones que confieren resistencia encontradas en poblaciones mayoritarias (>20 %) es menor que la frecuencia de mutaciones en población minoritarias (1-20 %) (Fig. 1).

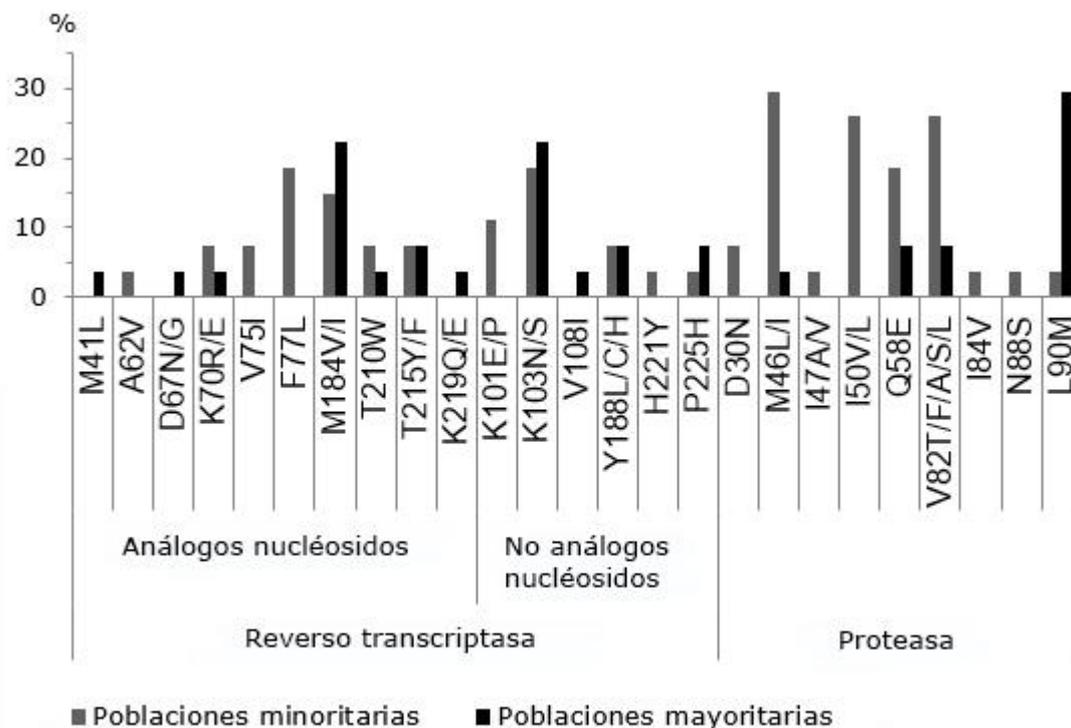


Fig. 1. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 con mutaciones que confieren resistencia a los ARV en poblaciones minoritarias (< 20 %) y mayoritarias (> 20 %).

Las mutaciones detectadas en los niños fueron: en poblaciones mayoritarias la V82T/F/A/S/L (8,3 %) y L90M (33,3 %) en la región de la PR y en la región de la

TI la M184V/I (16,7 %), T210W (8,3 %), T215Y/F (8,3 %) y K103N/S (16,7 %). En poblaciones minoritarias virales de los niños, las mutaciones más detectadas fueron M46L/I, I50V/L, Q58E (16,7 % cada una) en la región de la PR y en la región de la TI la V75I, M184V/I, K101E/P, F227L/C (16,7 % cada una) y K103N/S (25 %).

NIVELES DE RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES

Los niveles de resistencia a los medicamentos fueron mayores en las poblaciones virales minoritarias al compararlos con las mayoritarias.

En poblaciones minoritarias se encontró que el 64,6 % de los virus son sensibles a todos los medicamentos de la familia NRTI, siendo este el grupo de medicamentos con menores valores de resistencia. Los niveles de resistencia a los NNRTI y a los de IP, fueron elevados (43,5 % y 44,4 %, respectivamente), particularmente para los medicamentos efavirenz (EFV) y nevirapina (NVP) (68 %) de los NNRTI, y para atazanavir/ busteado con ritonavir (ATV/r), lopinavir (LPV/r), nelfinavir (NFV), fosamprenavir (FPV/r), indinavir (IDV/r) y saquinavir (SQV/r) (48,1 %) del grupo de los IP (Fig. 2, A).

En poblaciones mayoritarias se encontró que el 16,9 % de los virus son resistentes a los NRTI y el 18,5 % a los NNRTI, siendo estos los grupos de medicamentos con menores valores de resistencia. Se debe señalar que los virus tuvieron elevada resistencia a dos de los medicamentos de la familia de los NNRTI, el EFV y la NVP (29,6 %). Los niveles de resistencia de los virus frente a los medicamentos IP fueron altos (26,4 %), aunque frente a dos de los medicamentos de este grupo se presentaron niveles de resistencia bajos (darunavir o DRV/r con el 3,7 % y tipranavir o TPR/r con el 7,4 %), en poblaciones mayoritarias (Fig. 2, B).

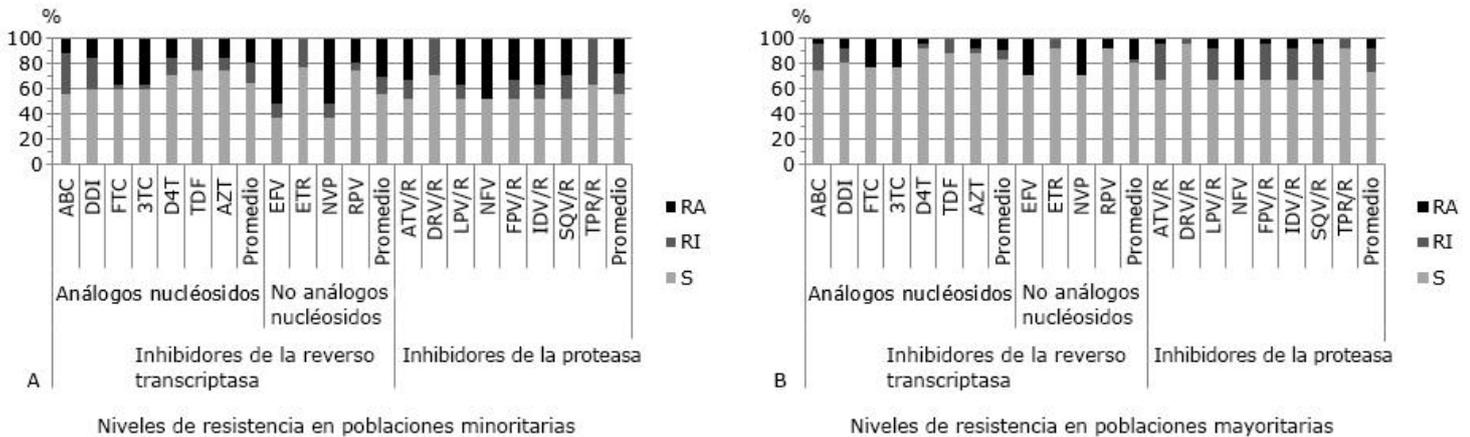


Fig. 2. Niveles de resistencia a los NRTI, NNRTI e IP en poblaciones minoritarias (A) y mayoritarias (B).

En las poblaciones virales mayoritarias de las muestras de los niños se encontró una elevada resistencia a los IP (50 %), mientras que la resistencia a los NRTI fue baja (16,7 %) e intermedia a los NNRTI (25 %).

En las muestras de dos pacientes se encontraron poblaciones virales mayoritarias con FCR a los NRTI (7,4 %), dos a los NNRTI (7,4 %) y uno a los IP (3,7 %). No

se encontró ninguna muestra con MDR en poblaciones virales mayoritarias. En poblaciones virales minoritarias, se encontraron tres virus (11,1 %) con FCR a los NRTI, cuatro (14,8 %) a NNRTI y seis (22,2 %) a IP, adicionalmente, dos virus tuvieron MDR. Se detectaron virus MDR en un niño de 1 año de edad; adicionalmente, se encontraron tres niños con virus FCR a los NNRTI, uno a los NRTI y tres a los IP en poblaciones minoritarias; mientras que en las poblaciones virales mayoritarias se encontraron tres niños que tenían virus FCR a una de las clases de drogas estudiadas (un niño con cada clase de drogas).

NIVELES DE RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES Y SU RELACIÓN CON EL TRATAMIENTO EMPLEADO

De forma general los pacientes que tuvieron un mayor número de esquemas terapéuticos presentaron mayores niveles de resistencia a los ARV, tanto en poblaciones virales mayoritarias como en las minoritarias. Se detectaron dos excepciones, los niveles de resistencia en los NNRTI en poblaciones virales (45,5 % en mayoritarias y 81,8 % en minoritarias) de los pacientes con dos esquemas y los niveles de resistencia a los IP en poblaciones virales de pacientes que habían utilizado un solo esquema de tratamiento (50 % en poblaciones virales mayoritarias y minoritarias, [Fig. 3, A, B y C](#)).

Al analizar la resistencia en poblaciones minoritarias y mayoritarias con respecto al antecedente del uso de cada uno de los ARV, se encontró que la familia de los NRTI fue la de los medicamentos empleados con mayor frecuencia en los pacientes estudiados (81,5 %), siendo el lamivudina (3TC) y el zidovudina (AZT) los más utilizados de este grupo. Contrasta el elevado uso del 3TC (81,5 %) con una frecuencia de mutaciones en poblaciones mayoritarias baja (22,2 %), un hallazgo similar se encuentra en el TDF y el AZT. No se obtuvieron los datos del tratamiento ARV de cinco pacientes ([Fig. 3, A, B y C](#) y [tabla 1](#)).

El EFV es el único NNRTI empleado por los pacientes analizados (66,7 %) y se encontró que las mutaciones en poblaciones virales minoritarias que confieren resistencia para este medicamento y para la NVP es elevada (63 %) ([Fig. 3, E](#)).

El 55,6 % de los pacientes que usaron IP, presentaron virus con elevada frecuencia de resistencia a los medicamentos de este grupo en poblaciones minoritarias (48,1 %) y mayoritarias (33,3 %). Aunque se debe señalar que los pacientes tratados con IP recibieron LPV/r (48,4 %), NFV (18,1 %) y DRV/r (3,7 %) solamente, y los niveles de resistencia en poblaciones mayoritarias fueron del 33,3 % para la mayoría de los medicamentos de este grupo (exceptuando el DRV/r y el TPR/r) ([Fig. 3, E](#)).

Se emplearon 18 esquemas terapéuticos en 22 pacientes ([tabla 2](#)). El tiempo de tratamiento ARV de los pacientes fue variado: comenzando en el 2004 y hasta el 2007, cinco pacientes; del 2008 al 2010, nueve pacientes y del 2011 al 2013, seis pacientes. No se encontró relación en cuanto al tiempo de tratamiento y la presencia de resistencia a los ARV (datos no mostrados).

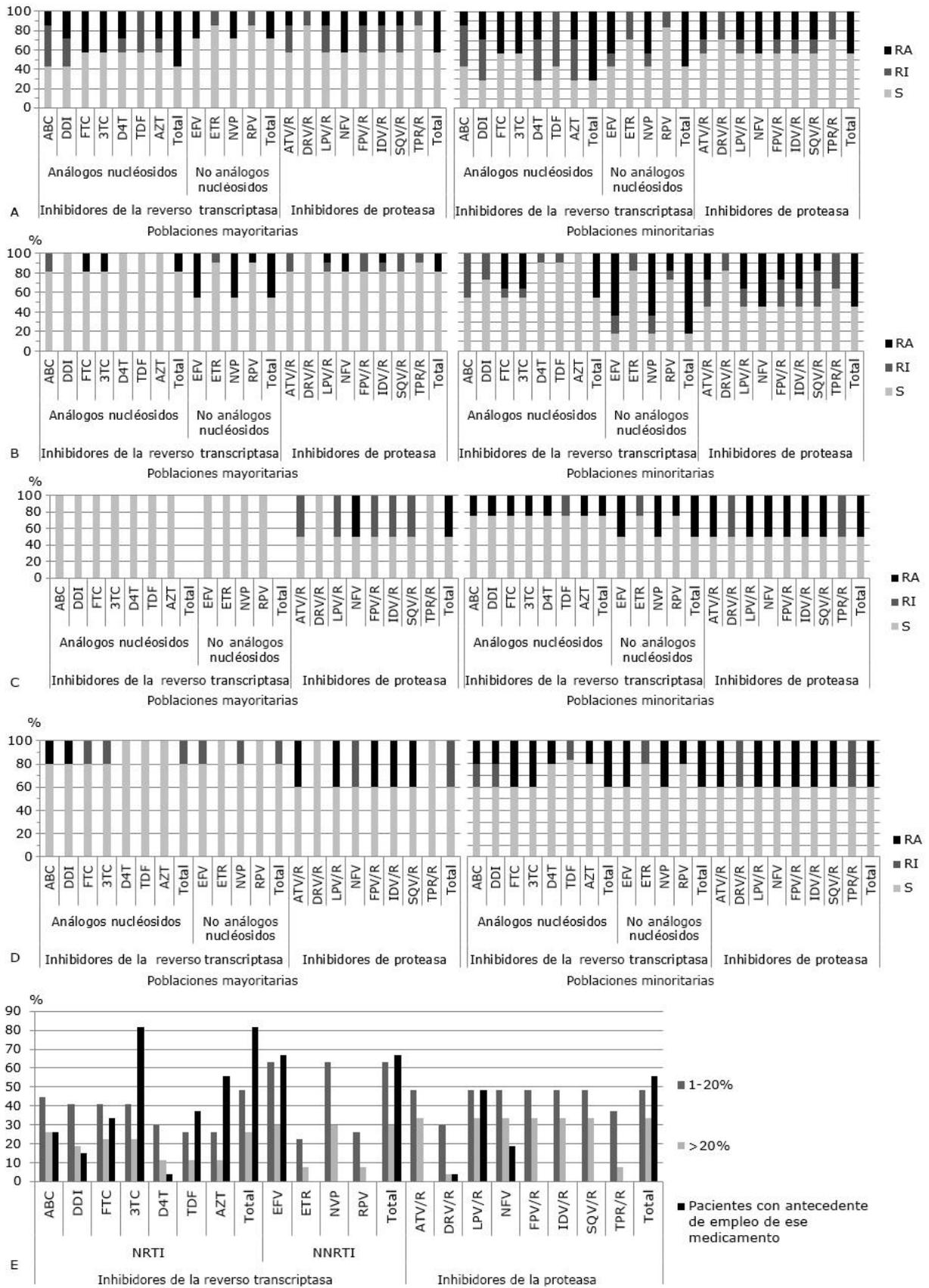


Fig. 3. Porcentaje de resistencia a los antiretrovirales en poblaciones minoritarias y mayoritarias, según ARV utilizados previamente (A: 3 esquemas terapéuticos; B: 2 esquemas terapéuticos; C: 1 esquema terapéutico; D: se desconoce cuántos esquemas terapéuticos han utilizado, y E: niveles de resistencia a los ARV y tratamiento previo con ese ARV).

Tabla 2. Esquemas terapéuticos empleados en adultos y niños. Ecuador, mayo 2013-febrero 2014

Esquema terapéutico	Primera combinación Adultos/Niños	Segunda combinación Adultos/Niños	Tercera combinación Adultos/Niños	Total Adultos/Niños
AZT+3TC+EFV	3/4	1/3	0/0	4/7
AZT+3TC+NFV	0 /4	0/1	0/0	0/5
AZT+3TC+LPV/r	1/2	0/2	0/1	1/5
AZT+3TC+RTV	0/1	0/0	0/0	0/1
3TC+LPV/r	0/1	0/0	0/0	0/1
ABC+DDI+LPV/r	0/0	0/1	0/1	0/2
EFV+ETV	0/0	0/1	0/0	0/1
TDF+EFV+DRV/r	0/0	0/0	0/1	0/1
TDF+FTC+EFV	1/0	4/0	0/0	5/0
3TC+DDI+EFV	1/0	0/0	0/0	1/0
DDI+3TC+LPV/r	1/0	0/0	0/0	1/0
D4T+3TC+EFV	1/0	0/0	0/0	1/0
3TC+ABC+EFV	2/0	0/0	0/0	2/0
3TC+ABC+LPV/r	0/0	1/0	0/0	1/0
TDF+FTC+RAL	0/0	1/0	1/0	2/0
TDF+FTC+LPV/r	0/0	2/0	2/0	4/0
ABC+EFV	0/0	1/0	0/0	1/0
AZT+3TC+RAL	0/0	0/0	1/0	1/0

CV: carga viral; M: masculino; F: femenino; BS: bisexual; HT: heterosexual; ND: no disponible; NA: no aplica; ABC: Abacavir; AZT: zidovudina; DRV: darunavir; D4T: estavudina; ddI: didanosina; EFV: efavirenz; FTC: Emtricitabina; LPV: lopinavir; NFV: nelfinavir; RAL: raltegravir; TDF: Tenofovir; 3TC: lamivudina; /r: potenciado con ritonavir.

RESISTENCIA A LAS TRES CLASES DE DROGAS Y CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA ESTUDIADA

Al analizar los valores del número de células T CD4+, se encontró que el 50 % de los pacientes que tenían datos de niveles de CD4 cercano a la toma de la muestra presentaba valores muy bajos (< 200 células/mm³). Menos del 30 % de los pacientes tenían niveles de células CD4+ mayor a 500 células/mm³. Los niveles de CD4+ menores a 200 e inclusive menores a 350 no se asociaron a una mayor resistencia (datos no mostrados). La determinación de los niveles de CD4 se realizó una mediana de 3 meses antes de la toma de la muestra analizada para la determinación de resistencia ARV (IQ1= 1 mes y IQ3= 8,5 meses).

Si analizamos los niveles de carga viral y la presencia de mutaciones que confieren resistencia (en general) a los ARV, se observa que el 50 % de los pacientes con alguna mutación tuvieron una alta carga viral (mayor a 10⁵ copias/mL), sin encontrarse asociación estadística entre estas variables. La determinación de los niveles de carga viral se realizó una mediana de 1 mes antes de la toma de la muestra analizada para la determinación de resistencia ARV (IQ1= 1 mes y IQ3= 3 meses).

SUBTIPOS

Veintiuno de los 27 virus estudiados en la región de la TI (77,8 %), se clasificaron como subtipo B, 3 pacientes con virus del subtipo CRF28_BF y no se pudo secuenciar la región de la TI en virus de 3 pacientes.

Al analizar la región de la PR, 21 virus se clasificaron como subtipo B (77,8 %) y 4 virus mostraron los subtipos CRF07_BC, CRF34_01B, CRF02_AG y subtipo F2. Fue imposible tipificar 2 virus en esta región.

Todos los virus tipificados fueron subtipo B en alguna de las dos regiones, o formas recombinantes con subtipo B.

Al analizar los subtipos encontrados y su relación con la resistencia ARV, se encontró que las poblaciones minoritarias de subtipo B tuvieron un mayor porcentaje de resistencia particularmente para algunos de los NRTI, e incluso mayor para el EFV y la NVP (Fig. 4, A).

En las poblaciones virales mayoritarias No B, los mayores valores de resistencia fueron los IP y algunos de los NRTI (Fig. 4, B).

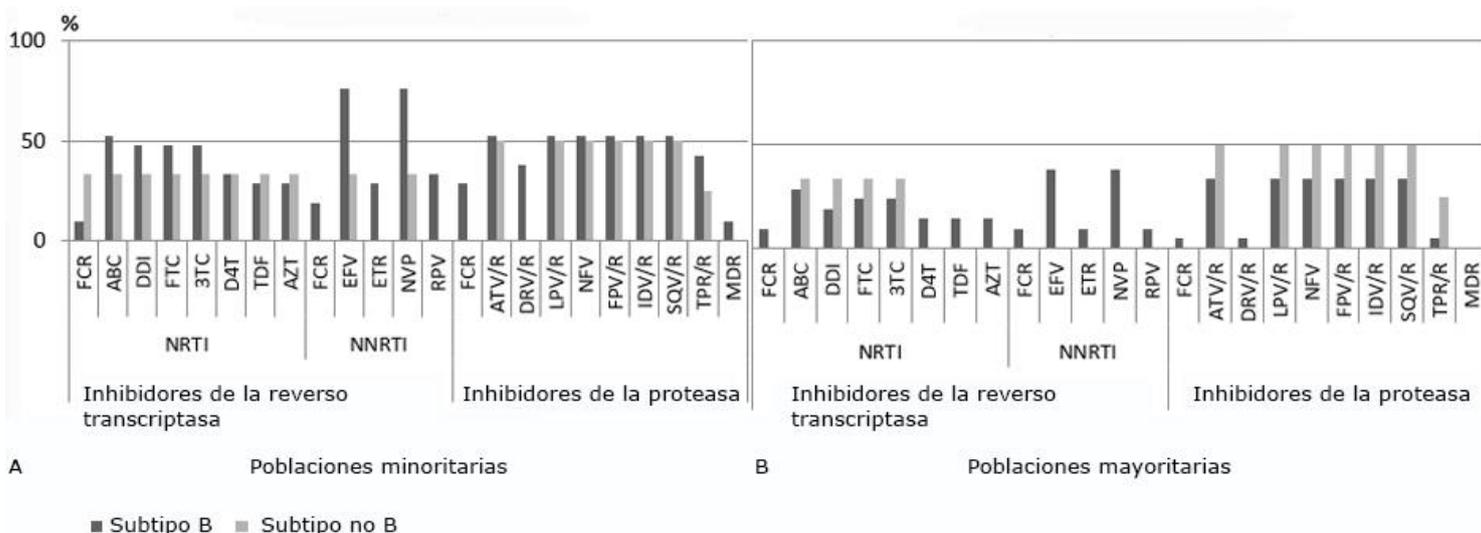


Fig. 4. Porcentaje de poblaciones virales minoritarias (A) y poblaciones virales mayoritarias (B) de VIH-1, que presentan resistencia a los medicamentos NRTI, NNRTI e IP, según el subtipo viral en PT o en TI.

Se encontró que no hubo una relación entre los subtipos y las mutaciones encontradas ($p > 0,05$).

Los subtipos virales en las muestras de sangre de los niños fueron mayoritariamente del subtipo B (10 virus con subtipo B en la región de la TI y 7 virus en la región de la PR), además se detectaron 3 subtipos más en PR (CRF07_BC, CRF02_AG y F2).

DISCUSIÓN

Los resultados de carga viral elevada y de niveles bajos de CD4 en pacientes tratados indican un fallo a la terapia de largo tiempo de evolución.¹³

No fue posible obtener resultados de pirosecuenciación de las poblaciones virales de 6 pacientes. Entre las posibles causas podemos destacar, el no contar con el dato reciente de carga viral y posibles problemas de temperatura durante el almacenamiento y transporte de las muestras. Además, no se dispuso de una segunda alícuota de muestra para repetir la pirosecuenciación.

La pirosecuenciación permite la detección de cuasiespecies minoritarias con capacidad discriminadora para detectar variantes virales que representan tan solo el 1 % de la población,¹⁴ incluyendo a poblaciones virales menores al 20 % resistentes a las drogas de aquellos pacientes con fallo a la terapia.¹⁵ Algunas observaciones sugieren que las cuasiespecies pueden emerger como poblaciones mayoritarias de virus después del inicio de la terapia de rescate en pacientes pretratados.¹⁶

La interpretación de las pruebas de resistencia que describen poblaciones virales minoritarias, si bien no es un criterio establecido para determinar qué medicamento ARV indicará el médico de asistencia a un paciente, puede orientar al médico sobre cuál puede ser la evolución de las poblaciones virales circulantes en el paciente y la potencialidad de desarrollar resistencia a algunos medicamentos.^{16,17}

En Ecuador, no se conoce cuál ha sido el comportamiento de la resistencia. El tamaño de la muestra estudiada en la actual investigación no permite realizar una valoración de la resistencia a los ARV en el país, pero constituye un estudio piloto en el cual se puede apreciar algunos de los problemas que ocurren en Ecuador. La inaccesibilidad a estudios de resistencia en la población con VIH-1 en Ecuador, la amplia accesibilidad a la terapia ARV y los resultados del presente estudio nos permiten plantear la hipótesis: los niveles de resistencia a los ARV en pacientes tratados es alta en Ecuador. Dicha hipótesis debería ser confirmada/refutada en aras del mejoramiento de la salud de las personas que viven con VIH/sida y de la correcta aplicación de políticas sanitarias.

En los países del área no se detectó un cambio en la prevalencia de resistencia a los ARV en 10 años.¹⁸ En África, y en particular en el este africano, la tendencia de la prevalencia es a aumentar.¹⁸ En Europa, los pacientes con falla virológica en 1997 era el 74,2 % y en el 2012 era solo el 5,1 %; de estas muestras el 77,9 % tenía resistencia, siendo la resistencia a los NRTI la más frecuente (70,3 %).¹⁹ En Francia, hubo una disminución de la prevalencia de la resistencia a ARV en pacientes con falla virológica.²⁰

Se encontraron pacientes con resistencia a las diferentes familias de drogas (FCR), en población mayoritaria y en un mayor número de poblaciones minoritarias virales, lo que indica un fallo de terapia de larga evolución, lo cual conduce a la acumulación de mutaciones de resistencia¹² y una reducción de sus opciones terapéuticas.

NIVELES DE RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES Y SU RELACIÓN CON EL TRATAMIENTO EMPLEADO

Se encontró que los pacientes analizados presentaban una amplia variedad de esquemas terapéuticos utilizados, lo cual difiere de lo recomendado.⁴ El mal manejo terapéutico se puede deber a no tener implementado estudios de resistencia para el adecuado tratamiento ARV, a una incorrecta indicación médica de las drogas o las combinaciones inadecuadas de estas, además de una pobre adherencia de los pacientes a los tratamientos.

Los pacientes estudiados con una mayor cantidad de esquemas terapéuticos tuvieron niveles de resistencia mayores. En pacientes con evidencia de fallo a la terapia, si se mantiene la misma combinación por tiempo prolongado, van acumulándose otras mutaciones que incrementan los niveles de resistencia.¹³

SUBTIPOS

Algunos subtipos han sido relacionados con algunas vías de transmisión, por ejemplo el subtipo B con los hombres que tienen sexo con hombres, así como algunas formas recombinantes con el uso de drogas intravenosas^{21,22} o recientemente, una forma recombinante con rápida progresión a sida.^{23,24} Las diferencias encontradas en el presente estudio dado lo pequeña y variado de la muestra no se establecieron de forma significativa.

La mayoría de los virus secuenciados fueron B puro y formas recombinantes de B, lo que concuerda con otros estudios en América.^{23,25} Identificar el subtipo es de importancia, porque se han descrito mutaciones que generan resistencia en algunos subtipos y no en otros (la 30 y la 90 para IP, la 106 para NNRTI, etc).²⁶

Al analizar la población infantil incluida, llama la atención que varios de ellos (ocho niños) recibieron dos o tres esquemas terapéuticos, que existieron dos niños con FCR y un número mayor con la potencialidad de tener FCR y MDR. El seguimiento de los niños infectados por VIH se hace más complejo, pues este grupo poblacional requiere que se analicen muestras seriadas a partir del nacimiento y de sus madres antes de comenzar el tratamiento ARV, en el parto y luego de este. Las opciones terapéuticas en los niños son limitadas pues no todos los medicamentos tienen formulaciones pediátricas y existe el inconveniente de la transmisión de cepas resistentes de la madre al feto.²⁷ Los estudios de resistencia en población pediátrica son necesarios tanto para aquellos niños tratados con falla a la terapia, como en aquellos que se comenzarán a tratar, para iniciar una terapia de primera línea altamente efectiva.²⁷

En conclusión, este estudio permitió la implementación del sistema de pirosecuenciación 454 para la región pol del VIH-1 que codifica para las proteínas proteasa y reverso transcriptasa, lo cual facilitó a su vez analizar los primeros datos de resistencia a ARV en Ecuador. Desafortunadamente, no disponemos de otros métodos o paneles de control para determinar la resistencia, que nos permitan validar la técnica empleada.

Para realizar un estudio con el objetivo de conocer los mutantes virales y su asociación con los niveles de resistencias a las drogas ARV es necesario realizar un análisis a un mayor número de muestras, contando con los datos clínicos, terapéuticos y epidemiológicos completos. Este estudio, permitiría además que se conozcan los subtipos y variantes genéticas del VIH-1 que circulan en Ecuador, así

como su posible relación con datos epidemiológicos. El estudio de una mayor cantidad de pacientes permitirá realizar sugerencias a las autoridades de salud ecuatorianas en cuanto al tratamiento ARV.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de Ecuador (SENESCYT) por el apoyo financiero y material a través del proyecto PIC-13-INSPI-ESPOL004 titulado: "Epidemiología Molecular de VIH en Ecuador". También quisiéramos agradecer al Dr. Washington Cárdenas por su apoyo en el diseño y ejecución del proyecto, que hizo posible esta publicación.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores no declaran conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taylor S, Jayasuriya A, Smit E. Using HIV resistance tests in clinical practice. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Aug [cited 2016 Oct 10];64(2):218-22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19535382
2. Aaltonen T. Estimaciones sobre el VIH y el sida (2015). 2015 [citado 10 Oct 2016]. Disponible en: <http://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/ecuador>
3. Pérez Santos L. Resistencia a las drogas antirretrovirales y diversidad genética del VIH-1 en Cuba. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2010 [citado 10 Oct 2016]. Available from: http://tesis.repo.sld.cu/309/1/lisette_perez.pdf
4. Vance C, Malo M, Armas N, Rodríguez Cadena N, Tobar R, Aguinaga G. Guía de atención integral para adultos y adolescentes con infección por VIH-sida. Quito; 2012 [citado 10 Oct 2016];114. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/guias-de-practica-clinica/>
5. Ministerio de Salud Pública. Antirretrovirales para pacientes con VIH se distribuyen con normalidad en todo el país. Quito: Ministerio de Salud Pública; 2016 [citado 10 Oct 2016]. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/antirretrovirales-para-pacientes-con-vih-se-distribuyen-con-normalidad-en-todo-el-pais/>
6. Kouanfack C, Montavon C, Laurent C, Aghokeng A, Kenfack A, Bourgeois A, et al. Low levels of antiretroviral-resistant HIV infection in a routine clinic in Cameroon that uses the World Health Organization (WHO) public health approach to monitor antiretroviral treatment and adequacy with the WHO recommendation for second-line treatment. *Clin Infect Dis.* 2009 May 1 [cited 2016 Oct 10];48(9):1318-22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19320592
7. Ravasi G. Recomendaciones de la OMS para la vigilancia de la farmacoresistencia del VIH y su aplicación en América Latina y Caribe. Panamá: OPS; 2012 [citado 8 Nov 2012]. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19333&Itemid

8. Dudley DM, Chin EN, Bimber BN, Sanabani SS, Tarosso LF. Low-Cost Ultra-Wide Genotyping Using Roche/454 Pyrosequencing for Surveillance of HIV Drug Resistance. PLoS ONE. 2012 [cited 2016 Oct 10];7(5):e36494. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3344889/>
9. GS Junior Sequencing Method Manual. Branford: 454 Life Sciences Corp. A Roche Company 2013 [cited 2016 Oct 10]. Available from: http://454.com/downloads/my454/documentation/gj-junior/method-manuals/GSJuniorSequencingManual_Jan2013.pdf
10. GS Junior emPCR Amplification Method Manual Lib-A. Branford: 454 Life Sciences Corp. A Roche Company; 2012 [cited 2016 Oct 10]. Available from: http://454.com/downloads/my454/documentation/gj-junior/method-manuals/GSJunioremPCRAmplificationMethodManualLib-A_March2012.pdf
11. Wensing AM, Calvez V, Günthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1. Top Antivir Med. 2014 [cited 2016 Oct 10];22(3):642-50. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4392881/>
12. Vercauteren J, Deforche K, Theys K, Debruyne M, Duque LM, Peres S, et al. The incidence of multidrug and full class resistance in HIV-1 infected patients is decreasing over time (2001-2006) in Portugal. Retrovirology. 2008 [cited 2016 Oct 10];5:12. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18241328
13. Gómez LF. Resistencia antirretroviral y variantes genéticas del VIH-1 en pacientes cubanos con fallo a la terapia, Enero-Junio del 2012. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2012 [citado 10 Oct 2016]. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1258/1/T-SENESCYT-00395.pdf>
14. Ji H, Massé N, Tyler S, Liang B, Li Y, Merks H, et al. HIV Drug Resistance Surveillance using pooled pyrosequencing. PLoS ONE. 2010 [cited 2016 Oct 10];5(2):e9263. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2822863/>
15. Alteri C, Santoro MM, Abbate I, Rozera G, Bruselles A, Bartolini B, et al. 'Sentinel' mutations in standard population sequencing can predict the presence of HIV-1 reverse transcriptase major mutations detectable only by ultra-deep pyrosequencing. J Antimicrob Chemother. 2011 Nov [cited 2016 Oct 10];66(11):2615-23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890537>
16. Le T, Chiarella J, Simen BB, Hanczaruk B, Egholm M, Landry ML, et al. Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. PLoS One. 2009 [cited 2016 Oct 10];4(6):e6079. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19562031
17. Hedskog C, Mild M, Jernberg J, Sherwood E, Bratt G, Leitner T, et al. Dynamics of HIV-1 quasispecies during antiviral treatment dissected using ultra-deep pyrosequencing. PLoS One. 2010 [cited 2016 Oct 10];5(7):e11345. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2898805/>
18. Gupta RK, Jordan MR, Sultan BJ, Hill A, Davis DH, Gregson J, et al. Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naive individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis. Lancet. 2012 Oct 6 [cited 2016 Oct 10];380(9849):1250-8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3790969/>

19. Schultze A, Phillips AN, Paredes R, Battegay M, Rockstroh JK, Machala L, et al. HIV resistance testing and detected drug resistance in Europe. *AIDS*. 2015 [cited 2016 Oct 10];29(11):1379-89. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26091300>
20. Assoumou L, Charpentier C, Recordon-Pinson P, Grudé M, Pallier C, Morand-Joubert L, et al. Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients with viral load >50 copies/mL: a 2014 French nationwide study. *J Antimicrob Chemother*. 2017 [cited 2016 Oct 10];72(6):1769-73. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkx042>
21. Huang SW, Wang SF, Cowó ÁE, Chen M, Lin YT, Hung CP, et al. Molecular Epidemiology of HIV-1 Infection among Men who Have Sex with Men in Taiwan in 2012. *PLoS One*. 2015 [cited 2016 Oct 10];10(6):e0128266. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0128266>
22. Cheong HT, Chow WZ, Takebe Y, Chook JB, Chan KG, Al-Darraj HA, et al. Genetic Characterization of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF74_01B) Identified among Intravenous Drug Users in Malaysia: Recombination History and Phylogenetic Linkage with Previously Defined Recombinant Lineages. *PLoS One*. 2015 [cited 2016 Oct 10];10(7):e0133883. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4510129/>
23. Gómez M, Salomón H, Pando M, Kijak G, Avila M. Distribución de subtipos y recombinantes del HIV: Situación en la Argentina. *Medicina*. 2001 [citado 10 Oct 2016];61:881-9. Disponible en: http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol61-01/6/v61_n6_p881_889.pdf
24. Kouri V, Khouri R, Alemán Y, Abrahantes Y, Vercauteren J. CRF19_cpx is an evolutionary fit HIV-1 variant strongly associated with rapid progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine*. 2015 [cited 2016 Oct 10];2:244-54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4484819/>
25. Aulicino PC, Holmes EC, Rocco C, Mangano A, Sen L. Extremely rapid spread of human immunodeficiency virus type 1 BF recombinants in Argentina. *J Virol*. 2007 Jan [cited 2016 Oct 10];81(1):427-9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797267/>
26. Santoro MM, Perno CF. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN Microbiology*. 2013 [cited 2016 Oct 10];2013:ID 481314.. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/481314>
27. Perez L, Correa C, Campos YA, Gonzalez I, Perez J, Martinez PA, et al. Drug-resistant HIV-1 in Cuban children and their seropositive mothers. *MEDICC Rev*. 2011 Apr [cited 2016 Oct 10];13(2):24-31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21654588>

Recibido: 18 de octubre de 2016.

Aceptado: 24 de julio de 2017.

Consuelo Correa-Sierra. Dirección de Investigación, Desarrollo e Innovación.
Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. Ecuador.
Correo electrónico: consuelocorreasierra@gmail.com